

魚病細菌 *Streptococcus iniae* のヒラメに対する
病原性と免疫原性における莢膜の役割

2006 年 12 月

長崎大学大学院生産科学研究科

首 藤 公 宏

目次

序論	1
第一章 特異多糖抗原の部分精製と免疫原性	5
材料および方法	6
結果	10
考察	12
図表	15
第二章 莢膜欠損変異株の作製	21
材料および方法	22
結果	28
考察	30
図表	33
第三章 莢膜欠損変異株の病原性	40
材料および方法	

.....	41
結果	46
.....	46
考察	49
.....	49
図表	53
.....	53
第四章 莢膜欠損変異株の免疫原性	61
.....	61
材料および方法	62
.....	62
結果	68
.....	68
考察	71
.....	71
図表	74
.....	74
総合考察	81
.....	81
要約	85
.....	85
引用文献	88
.....	88
謝辞	95
.....	95

序論

Streptococcus iniae はストレプトコッカス属に分類されるグラム陽性通性嫌気性球菌で 2 連または連鎖状に連なり、 β 溶血性（完全溶血）を示すことから β 溶血性レンサ球菌とも呼ばれる。*S. iniae* は Pier and Mardin (1976) によって 1972 年に淡水産イルカ（*Inia geoffrensis*）の膿瘍から初めて分離され報告された。*S. iniae* の宿主範囲は広く、これまで魚類やヒト（Weinstein *et al.*, 1997; Goh *et al.*, 1998; Lau *et al.*, 2003; Koh *et al.*, 2004）への感染が報告されている。特に魚類では世界中で感染例が報告されており、ティラピア（*Oreochromis niloticus*）、ニジマス（*Oncorhynchus mykiss*）、アユ（*Plecoglossus altivelis*）（Kitao *et al.*, 1981）、ハイブリッドティラピア（*Tilapia nilotica* \times *T. aurea*）（Perera *et al.*, 1994）などの淡水魚、ブリ（*Seriola quinqueradiata*）（Kaige *et al.*, 1984）、ヒラメ（*Paralichthys olivaceus*）（Nakatsugawa, 1983）などの海産魚が感染魚種に挙げられる。日本では、重要な養殖魚種であるヒラメにおいて *S. iniae* 感染症の発生件数が特に多い。

ヒラメの β 溶血性レンサ球菌症は、Nakatsugawa（1983）がその発症例を報告して以来瞬く間に全国に広がり、ヒラメ養殖における重要な細菌性疾病の一つとなった。本症は主として夏から秋にかけての高水温期に発生し、水温が低下すると終息する場合が多い。本症の被害率は 1 % から 10 % 前後とされているが、養殖期間中に 20 % を超える場合もあり、その損失は甚大である。本症を発病したヒラメには食欲不振や行動が不活発になるなどの症状のほか、眼

球の突出、白濁あるいは充血、頭部や上下顎、鰓蓋部の発赤、鰓の褪色、などの外観症状もみられる。また解剖所見として、腹水の貯留、肝臓のうっ血や褪色、腎臓や脾臓の腫脹などの症状がみられる。

現在ヒラメ養殖で唯一使用できるレンサ球菌症治療薬は塩酸オキシテトラサイクリンであるが、その使用には薬剤の残留による食の安全性等多くの問題がある。また近年愛媛県や大分県で本薬剤に対する低感受性株および耐性株の出現が報告されており、本薬剤に対する耐性化の助長が危惧される。これらのことから、本症ではワクチンによる予防法の確立が求められるようになった。

Lactococcus garvieae を原因菌とするブリの α 溶血性レンサ球菌症では *L. garvieae* ホルマリン不活化ワクチンが有効とされており、最近ではヒラメの β 溶血性レンサ球菌症においても *S. iniae* ホルマリン不活化ワクチンが実用化されるようになった。しかし、ワクチンの実用化に至った現在も、ヒラメに対する *S. iniae* の感染メカニズムおよび防除メカニズムに関する知見は乏しいのが現状である。このため、これらのメカニズムを解明することが急務であると考ええる。

病原細菌の感染・発病メカニズムを明らかにするには、細菌の病原性因子を特定する必要がある。*L. garvieae* において、莢膜保有株は莢膜非保有株と比べてブリに対して毒力が強いと報告されている (Kitao, 1982)。肺炎球菌、炭疽菌、インフルエンザ菌、髄膜炎菌、百日咳菌、ブドウ球菌などが莢膜を保有する病原細菌として知られており、多くの場合、莢膜は細菌の病原性因子となっている。莢膜は細胞壁の外側に位置し、多糖やペプチドで構成されている。莢膜を保有する細菌は、宿主の貪食作用に抵抗性を有し (抗貪食作用)、貪食されても食細胞の殺菌作用から自身を守ることができる (抗殺菌作用)。また

莢膜多糖は耐熱性の莢膜抗原（K 抗原）として知られ、肺炎球菌（肺炎双球菌）では免疫学的特異性を決定していることから血清学的な型分類（血清型）に利用される。同時に肺炎球菌感染症に対する重要な防御抗原としても利用されている。ヒラメ病魚から分離された *S. iniae* は生物学的・生化学的性状では分類できないが、血清学的性状により K^+ type と K^- type の 2 型に分類される。 K^+ type の菌株は、抗 K^+ type ウサギ血清に凝集し抗 K^- type ウサギ血清に凝集しない。 K^- type の菌株は、抗 K^+ type ウサギ血清および抗 K^- type ウサギ血清に凝集する（Kanai *et al.*, 2006）。また、*S. iniae* をオートクレーブで加熱抽出すると K^+ type の菌体抽出液に特異的な抗原（特異抗原）が検出されるが K^- type の菌体抽出液には検出されない。さらに、 K^+ type の菌体表層には莢膜が認められるが、 K^- type には莢膜が認められない。特異抗原も莢膜も K^+ type に特異的であることから、 K^+ type の特異抗原は莢膜の構成成分であると推察された。 K^+ type が抗 K^- type ウサギ血清に凝集しないのは、莢膜が両タイプの共通抗原とそれに対する抗体の結合をさえぎるからと推察された。また Kanai ら（2006）は、 K^+ type は毒力が強く、 K^- type は毒力が弱いとし、ヒラメに対する免疫試験では、 K^+ type で作製したホルマリン死菌（FKC）はワクチンとして有効であるが、 K^- type で作製したホルマリン死菌は無効であったと報告している。

これらのことから、*S. iniae* K^+ type の特異抗原は莢膜の構成成分であり、ヒラメに対する重要な病原性因子である、またヒラメの獲得免疫における防御抗原であることが示唆された。そこで第一章では特異抗原と莢膜の関連性を明らかにするために特異抗原を部分精製しその性状を調べた。また粗精製特異抗原でヒラメを免疫し粗精製特異抗原の防御抗原としての効果を調べた。第二章

では莢膜欠損変異株を作製し、特異抗原と莢膜の関連性を遺伝子レベルで検討した。第三章では作製した莢膜欠損変異株のヒラメに対する病原性とヒラメ腹腔内マクロファージに対する抵抗性について調べた。第四章では莢膜欠損変異株からホルマリン不活化ワクチンを作製し、莢膜の防御抗原としての役割を検討した。

第一章 特異抗原の部分精製と免疫原性

Kanai ら (2006) は、ヒラメ病魚から分離された *S. iniae* は血清学的性状から K^+ type と K^- type に区別できるとし、 K^+ type には菌体表層に莢膜様構造物が認められ、菌体のオートクレーブ抽出液には K^+ type に特異的な抗原 (特異抗原) が検出されると報告した。特異抗原および莢膜は K^+ type に特異的であるため双方の関連性が推察される。そこで *S. iniae* NUF631 (K^+ type) から特異抗原を部分精製してその性状を調べた。また粗精製特異抗原をヒラメに接種し、*S. iniae* の攻撃に対する本抗原の免疫防御効果について調べた。

第一章 材料および方法

1. 供試菌株

当研究室で液体窒素中に凍結保存されているヒラメ由来 *S. iniae* NUF44 (K⁻ type) と NUF631 (K⁺ type) を用いた。

2. 培養方法

S. iniae を Todd-Hewitt (TH; ディフコ) 寒天培地 (THA) に塗抹し、27 °C で 18 時間培養した。以後、特に記載がない場合はこの培養方法を用いた。

3. *S. iniae* に対するウサギ抗血清

当研究室で凍結保存されている抗 NUF631 FKC ウサギ血清と抗 NUF44 FKC ウサギ血清を使用した。

4. オートクレーブによる菌体抗原の抽出

S. iniae NUF631 と NUF44 を TH 液体培地 (THB) で振とう培養後、生理食塩水で数回遠心洗浄 (4 °C、7,000 rpm、10 min) し、湿菌量が 0.4 g/mL 生理食塩水となるように懸濁した。菌懸濁液をオートクレーブ (121 °C、30 min) し、

上清をオートクレーブ菌体抽出抗原とした。

5. オートクレーブ菌体抽出抗原のゲル内沈降反応および免疫電気泳動

ゲル内沈降反応では、PBS で作製した 1 % アガロース (バイオ・ラッド) ゲル板上で、*S. iniae* NUF631 および NUF44 のオートクレーブ菌体抽出抗原と抗 NUF631 FKC ウサギ血清を反応させた (室温、一晚)。免疫電気泳動では、0.05 M バルビタール緩衝液 (pH 8.6) で 1 % アガロースゲルを作製し、各オートクレーブ菌体抽出抗原をゲル板に作製した穴に添加した後 2 mA/cm で 90 分間電気泳動した。その後、抗 NUF631 FKC ウサギ血清とゲル板上で反応させた (室温、一晚)。

6. 特異抗原の部分精製

攪拌しながらオートクレーブ菌体抽出液に 4 倍量のエタノールを加え、生じた沈殿を遠心分離 (7,000 rpm、15 min) で回収し、1 時間風乾した。乾燥した沈殿を 1 % となるよう 1 M NaCl 溶液に溶解し、2 % セチルトリメチルアンモニウムブロミド (セタブロン、和光純薬) 0.1 M NaCl 溶液を沈殿とセタブロンの重量比が 1:2 となるように加え、生じた沈殿を遠心分離 (10,000 rpm、15 min) して除去した。上清に 9 倍量の蒸留水を攪拌しながら滴下し、NaCl 濃度を 0.01 M とした。生じた沈殿を遠心分離 (7,000 rpm、15 min) で集め、少量の 1 M NaCl に溶解した後、4 倍量のエタノールを加え、生じた沈殿を遠心分離 (7,000 rpm、15 min) で回収し蒸留水に溶解した。これを 0.01 M リン酸

緩衝液（PB; pH 8.0）で 12 時間透析した。0.01 M PB で平衡化した DEAE-Sephacel（アマシャム・バイオサイエンス）カラム（1 × 25 cm）に試料を添加し、0.01 M PB で非吸着物質を溶出した後、0→0.3 M NaCl 含 PB（pH 8.0）で直接的濃度勾配をかけ吸着物質を溶出した。フラクションごとにフェノール硫酸法（Dubois *et al.*, 1956）による糖の検出および抗 NUF631 FKC ウサギ血清とのゲル内沈降反応による特異抗原の検出を行った。なお、ゲル内沈降反応では各フラクションの 2 倍希釈系列を抗血清と反応させ、特異抗原が検出された最大希釈度で抗原量を表した。双方のピークの一致したフラクションをプールし、4 倍量のエタノールを加え、生じた沈殿を 7,000 rpm で 15 分間遠心分離して集め、蒸留水に溶解したものを粗精製特異抗原とした。

7. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

電気泳動は Min and Cowman (1986) の Sensitivity-Enhanced Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SE-PAGE) で行った。電気泳動装置はスラブ・ディスク電気泳動装置 SJ-1060・SDH 型（アトー株式会社）を用い、通電はゲル 1 枚あたり 100 V、25 mA で 6 時間行った。泳動後 Alcian blue 染色と Silver 染色の二重染色を行った（Merril *et al.*, 1981）。

8. 粗精製特異抗原の免疫効果試験

8.1. *S. iniae* FKC の調製

NUF631 を THB に接種し振とう培養した（120 rpm、27 °C、24 h）後、ホルマリン（和光純薬）を 0.5 % 加えて室温で 48 時間静置し、菌を不活化した。遠心分離で菌体を集め、滅菌 PBS で 3 回洗浄しホルマリンを除いた。不活化菌を 0.02 % NaN_3 加 PBS に 100 mg/mL の濃度で懸濁し、4 °C で保存した。

8.2. 免疫方法

粗精製特異抗原を凍結乾燥した後 PBS にそれぞれ 0.06、0.6、6 mg/mL の濃度で溶解し、ヒラメ（130.1 ± 21.3 g）15 尾に 0.5 mL/100 g 魚体重の割合で腹腔内接種した。また、NUF631 FKC を PBS に 4 mg/mL の濃度で懸濁し 0.5 mL/100 g 魚体重の割合で腹腔内接種した。対照区には PBS を接種した。試験区ごとにフィンカットで標識し、1,000 L パンライト水槽に収容して給餌しながら 2 週間流水飼育した。試験期間中の平均水温は 26.3 °C であった。

8.3. 攻撃方法

NUF631 を THA で培養後、PBS に約 10^{10} cfu/mL の濃度で懸濁した。菌懸濁液を 0.1 mL/100 g 魚体重の割合で各試験区 15 尾の体側筋肉に接種し、1,000 L パンライト水槽に収容し、無給餌で 2 週間流水飼育した。死亡魚および試験終了後の生残魚から菌の再分離を行った。試験期間中の平均水温は 26.2 °C であった。

第一章 結果

1. 特異抗原の部分精製

Fig. 1 に *S. iniae* NUF631 および NUF44 の抗 NUF44 FKC ウサギ血清に対する凝集反応を示した。NUF44 は抗 NUF44 FKC ウサギ血清で凝集するが NUF631 は凝集しない。アガロースゲル内でこれら菌株のオートクレーブ菌体抽出液を抗 NUF631 FKC ウサギ血清と反応させると、血清側に NUF631 および NUF44 に共通の抗原（共通抗原）がみられた。また NUF631 にのみ共通抗原の外側に特異的な抗原（特異抗原）がみられた（Fig. 2）。さらにアガロースゲル電気泳動では、特異抗原は陽極側に移動した（Fig. 3）。

特異抗原の部分精製では各精製段階で試料を抗 NUF631 FKC ウサギ血清と反応させ、特異抗原が検出されることを確認しながら行った。粗精製特異抗原を陰イオン交換クロマトグラフィーで分画後、フラクションごとにフェノール・硫酸法で発色させ 490 nm の波長で糖質の検出を試みたところ、40 から 47 のフラクションでピークが 1 つ得られた。またこれらのフラクションから特異抗原が検出された（Fig. 4）。そこで各フラクションをプールし 4 倍量のエタノールで特異抗原を回収し、SE-PAGE を行った。泳動後アルシアンブルー銀染色で糖質の検出を試みたところ、梯子状のバンドが現れた（Fig. 5）。なお NUF44 のオートクレーブ菌体抽出液をエタノール・セタブロン分画後電気泳動し糖質の検出を試みたが、梯子状のバンドは観察されなかった（date not shown）。

2. 粗精製特異抗原の免疫効果試験

攻撃後 9 日目には NUF631 FKC 免疫区、0.03 mg 粗精製特異抗原免疫区で PBS 接種区と有意差がみられた ($p < 0.05$)。しかし攻撃後 14 日目には NUF631 FKC 免疫区、粗精製特異抗原免疫区は PBS 接種区と有意差がみられなかった (Fig. 6)。また、すべての死亡魚からは K^+ type が再分離され、死亡魚の症状として口唇や鰭の発赤、腎臓・脾臓の腫大、肝臓のうっ血などがみられた。

第一章 考察

1. 特異抗原の部分精製

NUF44 (K^- type) は抗 NUF44 FKC ウサギ血清で凝集するが、NUF631 (K^+ type) は凝集しない (Fig. 1)。両株のオートクレーブ菌体抽出液を抗 NUF631 FKC ウサギ血清と反応させると双方に共通の抗原と NUF631 に特異的な抗原が観察される (Fig. 2)。また共通抗原は電氣的に中性であるのに対して特異抗原は陰性である (Fig. 3)。Kanai ら (2006) は共通抗原も特異抗原もトリクロロ酢酸 (TCA) で処理した菌体抽出液から検出されるため糖質ではないかとしている。また免疫電気泳動では特異抗原は陽極側で検出されることから特異抗原はマイナスに帯電した糖質 (酸性多糖) ではないかと報告している。そこで NUF631 のオートクレーブ菌体抽出液から特異抗原をエタノール・セタブロン分画後、陰イオン交換クロマトグラフィーで部分精製しフェノール・硫酸法で糖質を検出したところ、ピークが 1 つ得られた。また得られたピークの各フラクションから特異抗原が検出された (Fig. 4)。さらに各フラクションをプールしたものを SE-PAGE 後ゲルをアルシアンブルー染色と銀染色の二重染色を施したところ、梯子状のバンドがみられた (Fig. 5)。しかし、NUF44 のオートクレーブ菌体抽出液を電気泳動してもこのようなバンドはみられなかった (date not shown)。一般に酸性多糖はポリアクリルアミドゲル電気泳動すると、等間隔にバンドを形成すると報告されている (Min and Cowman, 1986; Pelkonen *et al.*, 1988)。このような現象は糖質成分が単糖またはオリゴ糖の繰り返し構造によつ

て構成されているためと考えられる。また菌体をオートクレーブで抽出したため、抽出抗原は菌体表層抗原であると推察される。 K^+ type には菌体表層に莢膜がみられる。莢膜は一般に酸性多糖で構成されており、A 群レンサ球菌の莢膜はヒアルロン酸莢膜と呼ばれ N-アセチル-D-グルコサミンと D-グルクロン酸が互いに β -グリコシド結合をしたオリゴ糖の繰り返し構造をとる酸性多糖である (Llull *et al.*, 2001)。これらのことから、特異抗原は K^+ type に特異的な酸性多糖抗原であり莢膜の構成成分である可能性が考えられた。しかし、本研究では構成多糖の成分は明らかにされなかったため今後はさらに精製を進めさらなる構造解析を行う必要がある。

2. 粗精製特異抗原のヒラメに対する免疫原性

莢膜多糖抗原は特異的生体防御における重要な防御抗原として知られている。ヒトにおける肺炎球菌感染症では、現在 90 以上の血清型に分類される肺炎球菌のうち 23 血清型より精製された各莢膜多糖抗原を多価ワクチンとして利用している (Artz *et al.*, 2003)。Kanai ら (2006) はヒラメを K^+ type (莢膜有・特異抗原有) FKC で免疫すると K^+ type (強毒株) に対して防御効果が得られるが、 K^- type (莢膜無・特異抗原無) FKC で免疫しても防御効果は得られなかったと報告している。また本研究では NUF631 (K^+ type) より得られた特異抗原は酸性多糖であり莢膜の構成成分であることが考えられたことから、特異抗原は *S. iniae* K^+ type に対する重要な防御抗原である可能性が示唆された。そこで、粗精製特異抗原を魚体重 100 g あたり 3 mg、0.3 mg、0.03 mg となうようにヒラメに接種し、NUF631 に対する免疫効果を検討した。その結果、菌接種後 9

日目までは 0.03 mg 接種区の生残率と対照区の生残率の間に有意差がみられた。また粗精製特異抗原の接種濃度が高いほど免疫効果が低い傾向にあり、特に 3 mg 接種区の生残率は対照区とほとんど差がなかった (Fig. 6)。菌接種後 14 日目には 0.03 mg 接種区も生残率に対照区との有意差がみられなくなったが、NUF631 FK 接種区に近い死亡経過を示していることから、特異抗原を 0.03 mg/100 g 魚体重の濃度で接種すると NUF631 に対する免疫効果が得られると考えられた。また 3 mg 接種区では生残率が対照区と差がなかったことから、特異抗原の濃度が高すぎると免疫効果が得られないと考えられた。

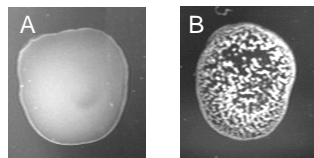


Fig. 1. Agglutinating reaction of *S. infantis* K⁺ type and K⁻ type strains. Bacterial cells were mixed with rabbit anti-NUF44 serum. A, NUF631 cells; B, NUF44 cells.

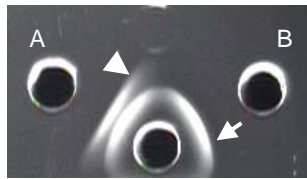


Fig. 2. Immunodiffusion test of autoclave-extracted antigens from *S. iniae* K⁺ type and K⁻ type strains. A, NUF631; B, NUF44; Center well, rabbit anti-NUF631 serum; Arrow head, K⁺ type-specific antigen; Arrow, common antigen.

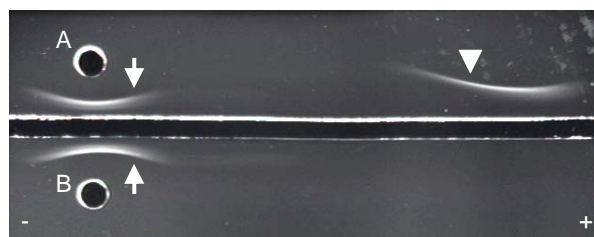


Fig. 3. Immunoelectrophoresis test of autoclave-extracted antigens from *S. iniae* K⁺ type and K⁻ type strains. A, NUF631; B, NUF44; Center trough, rabbit anti-NUF631 serum; Arrow head, K⁺ type-specific antigen; Arrow, common antigen.

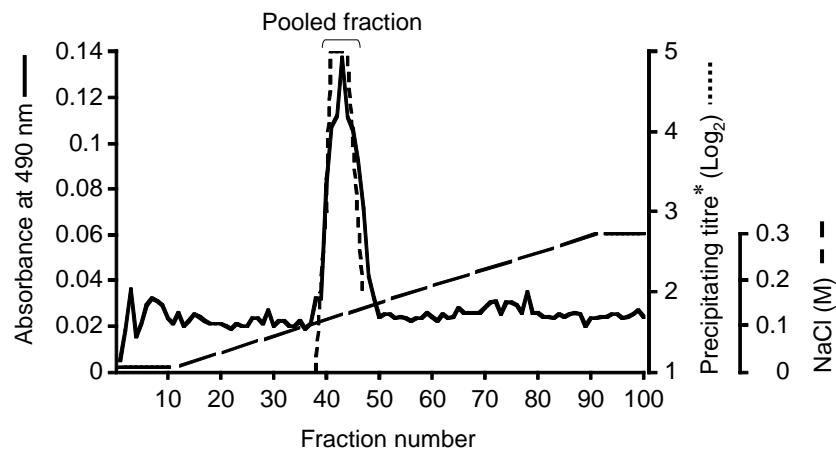


Fig. 4. DEAE-Sephacel ion-exchange column (1 × 25 cm) chromatography of K⁺ type-specific antigen fractionated by Cetabron. Pooled fraction was concentrated by ethanol precipitation. Buffer, 0.01 M phosphate-buffer (pH 8.0). *, precipitating titre (Log₂) of rabbit anti-NUF631 serum against K⁺ type-specific antigen of each fraction.



Fig. 5. Sensitivity-enhanced polyacrylamide gel electrophoresis (SE-PAGE) of K⁺ type-specific antigen. Acidic polysaccharides were detected by alcian blue-silver stain. Sample, pooled fraction concentrated by ethanol precipitation after DEAE-Sephacel ion-exchange chromatography .

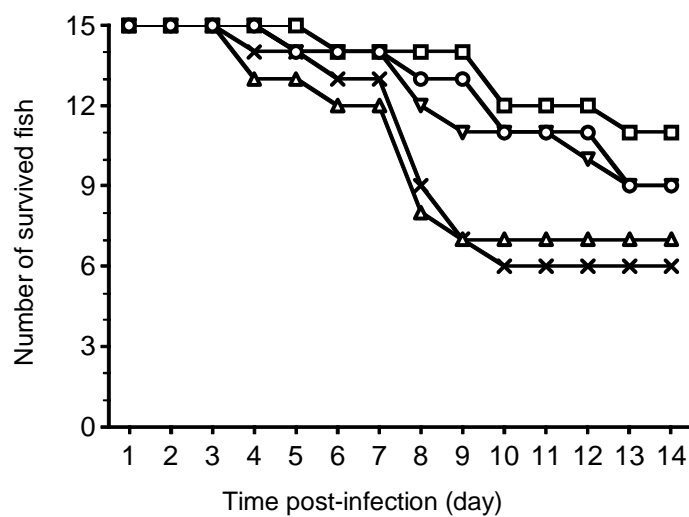


Fig. 6. Protective efficacy of K⁺ type-specific antigen in artificial infection with *S. iniae* NUF631. Δ, Inoculated dose of 3 mg specific antigen/100 g body weight; ▽, Inoculated dose of 0.3 mg specific antigen/100 g body weight; ○, Inoculated dose of 0.03 mg specific antigen/100 g body weight; □, 2 mg NUF631 FK/100 g body weight; ×, PBS.

第二章 莢膜欠損変異株の作製

第一章では、*S. iniae* K⁺ type のオートクレーブ菌体抽出液から部分精製した特異抗原には酸性多糖が検出されることを述べた。一般に莢膜は多糖体から成ることが多いことから、*S. iniae* の特異抗原は酸性多糖であり莢膜の構成成分であることが示唆された。

そこで、本章では染色体 DNA 間を自由に移動できる転移因子（トランスポゾン; Tn916）を利用して K⁺ type から特異抗原のみ欠損した変異株を作製し、特異抗原と莢膜の関連性を検討した。また *S. iniae* K⁺ type の染色体 DNA に挿入されたトランスポゾンに隣接する *S. iniae* の塩基配列をシーケンスし、変異した遺伝子を調べた。

第二章 材料および方法

1. 供試菌株

当研究室で液体窒素中に凍結保存されているヒラメ病魚由来の *S. iniae* NUF631 (K⁺ type) を用いた。変異株作製に用いたテトラサイクリン耐性遺伝子を有するトランスポゾン供与株には *Enterococcus faecalis* CG110 を用いた。本研究ではストレプトマイシンおよびテトラサイクリンの 2 薬剤に対する感受性を利用してトランスポゾンの伝達株を選抜した。硫酸ストレプトマイシン (SM) および塩酸テトラサイクリン (TC) に対する NUF631 の最小発育阻止濃度 (MIC) は、それぞれ 50 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、CG110 のそれは、それぞれ 400 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ であった。

2. ストレプトマイシン耐性 NUF631 のスクリーニング

トランスポゾンを接合伝達させた際に、ストレプトマイシンによって *E. faecalis* の発育を阻止し NUF631 を発育させるために、以下の方法で NUF631 のストレプトマイシン耐性株を作製した。NUF631 のストレプトマイシン耐性株の選抜には Charland ら (1998) の報告を参考にした。硫酸ストレプトマイシンを 100 $\mu\text{g/mL}$ 含有する THA (100 $\mu\text{g SM/mL THA}$) に、NUF631 を接種し、27 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間培養した。発育したコロニーを 800 $\mu\text{g SM/mL THA}$ に植え継ぎ、27 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間培養した。さらに、発育したコロニーを 1,600 $\mu\text{g SM/mL THA}$ に植

え継ぎ、発育したコロニーを SM 耐性 NUF631 とし以後の実験に供した。

3. 特異抗原欠損誘発試験

3.1. 接合伝達

トランスポゾンをもつ SM 耐性 NUF631 の染色体 DNA に挿入するため、CG110 と SM 耐性 NUF631 を接合させた。各菌株をそれぞれ THB で、27 °C、15 時間振とう培養した。培養菌を THB で遠心洗浄（10,000 rpm、1 min）し、THB に再懸濁した。CG110 と NUF631 の菌数の比率が 1:5 となるように両者を混合し、ろ過滅菌用フィルター上に集菌した。集めた菌が上になるように、ウマ脱繊維血を 5 % 含む THA にフィルターを載せ、27 °C で 18 時間培養した。

3.2. テトラサイクリン ・ ストレプトマイシン耐性株の選抜

培養後、フィルター上の菌体を THB 1 mL に懸濁した。硫酸ストレプトマイシンと塩酸テトラサイクリンを添加した THA（1,600 μ g SM ・ 50 μ g TC/mL THA）に菌懸濁液を塗抹し、28 °C で 48 時間培養した。発育したコロニーを 1,600 μ g SM ・ 50 μ g TC/mL THA にそれぞれ移植し、SM ・ TC 耐性 NUF631 とした。

3.3. 凝集反応によるスクリーニング

S. iniae の K^+ type (特異抗原有) は抗 NUF44 FKC ウサギ血清に凝集しないが、 K^- type (特異抗原無) は凝集する (Fig. 1)。そこで抗 NUF44 FKC ウサギ血清との凝集性によって K^+ type から K^- type に変異した株を選抜した。THB を 100 μ L ずつ分注した滅菌 96 穴プレートに各 SM・TC 耐性 NUF631 を接種し、27 $^{\circ}$ C で 15 時間振とう培養した。培養後、凝集試験用 96 穴プレートに各培養液を 25 μ L ずつ移し、抗 NUF44 FKC ウサギ血清の 50 倍希釈液を等量加え攪拌した後、室温で 15 時間静置した。凝集を起こした菌株を 1,600 μ g SM・50 μ g TC/mL THB で 27 $^{\circ}$ C、15 時間振とう培養後、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

3.4. ゲル内沈降反応によるスクリーニング

抗 NUF44 FKC ウサギ血清に凝集した菌株を THB で振とう培養した。集菌後、第一章 4. に従いオートクレーブ菌体抽出抗原を得た。抗 NUF631 FKC ウサギ血清とオートクレーブ菌体抽出抗原をアガロースゲル板上で反応させ (室温、一晚)、特異抗原を示す沈降線が現れない株を特異抗原欠損変異株とした。

4. 染色体 DNA からのトランスポゾン検出

4.1. 染色体 DNA の抽出

染色体 DNA の抽出は Aqua Pure Genomic DNA Kit (バイオ・ラッド) を用いて付属説明書に従って行い、抽出した染色体 DNA は使用するまで 4 $^{\circ}$ C で

保存した。

4.2. トランスポゾン塩基配列からのオリゴヌクレオチドの作製

使用したオリゴヌクレオチドを Table 1 に示した。National Center for Biotechnology Information (NCBI) の GenBank から取得したトランスポゾン (Tn 916) の全塩基配列 18,032 bp に基づき、Tn-1、Tn-5R、Tn-10F、Tn-11F、Tn-12R を設計した。

4.3. オリゴヌクレオチドの 3' 末端ラベリング

DIG Oligonucleotide 3' -End Labeling Kit (ロシュ・ダイアグノステイクス) を用い、付属説明書に従って Tn-1 の 3' 末端をジゴキシゲニンでラベルした後、TE バッファーに溶解した。

4.4. 染色体 DNA の制限酵素処理

酵素消化には *Hind*III (日本ジーン) を用いた。染色体 DNA 溶液 10 μ L に *Hind*III を 20 unit 加え、37 °C のウォーターバスで 19 時間インキュベートした。さらに *Hind*III を 20 unit 加えて 1 時間追加処理した。

4.5. サザンハイブリダイゼーション

DIG 標識 Tn-1 プローブとのサザンハイブリダイゼーションは DIG アプリケーションマニュアル（ロシュ・ダイアグノスティクス）を参考にして行った。酵素消化後の染色体 DNA を 0.8 % のアガロースゲルで電気泳動後、ナイロン膜（Hybond-N+、アマシャム・バイオサイエンス）へトランスファーした。ナイロン膜に固定した DNA は DIG 標識 Tn-1 プローブとハイブリダイゼーション後、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体（ロシュ・ダイアグノスティクス）と反応させた。CDP-Star（ロシュ・ダイアグノスティクス）を加え発光させた後、カセット内（Hypercassette、アマシャム・バイオサイエンス）で X 線フィルム（Hyperfilm、アマシャム・バイオサイエンス）に撮影した。

5. トランスポゾン挿入隣接配列の DNA シークエンス

特異多糖抗原欠損変異株の染色体 DNA を前述の方法で *Hind*III 消化した。DNA 断片のセルフライゲーションには DNA Ligation Kit Ver. 2.1（タカラ・バイオ）を使用した。インバース PCR は以下の条件で行った。First PCR には Tn-10F および Tn-12R、Nested PCR には Tn-11F および Tn-5R のプライマーを使用し（Table 1）、それぞれサーマルサイクラーで 94 °C で 5 分 DNA を変性させた後、94 °C で 1 分、50 °C で 45 秒、72 °C で 5 分の行程を 30 回繰り返した。アガロースゲル電気泳動後、PCR 産物を切り出して精製し、pGEM-T Easy Vector Systems（プロメガ）を使用して TA クローニングを行った。DNA シークエンスには Dye Terminator 法に従い BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライド・バイオシステムズ）を用いて ABI 3100 DNA sequencer（ア

プライド・バイオシステムズ) により行った。得られた塩基配列から推定されるアミノ酸配列について、NCBI の BLASTX プログラムを用いデータベース上でホモロジー検索を行った。

6. ポリアクリルアミドゲル電気泳動による酸性多糖の検出

第一章 6. に従ってオートクレーブ抽出抗原をエタノール・セタブロン分画し、これを試料として第一章 7. の方法でポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。

7. 電子顕微鏡観察

電子顕微鏡観察は Kanai ら (2006) の方法に従った。すなわち、菌体を PBS に懸濁し、抗 NUF631 FKC ウサギ血清を加え 4 °C で 3 時間静置後、遠心分離 (7,000 rpm、15 min) で回収した菌体を試料とした。各試料を 5 % グルタルアルデヒド・0.15 % ルテニウムレッド・0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、室温で 2 時間固定した。さらに、2 % 四酸化オスミウムで後固定後、常法に従ってエタノール系列で脱水し、Spurr 樹脂に包埋後超薄切片を作製し、酢酸ウラニル・クエン酸鉛で二重染色した後電子顕微鏡 (JEOL JEM-100S) で観察を行った。

第二章 結果

1. 特異抗原欠損変異株の選抜

ストレプトマイシン・テトラサイクリンを添加した THA から約 3,000 コロニーの *S. iniae* を分離した。これらを抗 NUF44 FKC ウサギ血清と反応させたところ、11 株（4-58、4-79、4-94、6-20、9-16、10-15、10-86、11-19、11-34、11-36、13-96）が凝集反応を示し（Fig. 7）、そのオートクレーブ菌体抽出液には抗 NUF631 FKC ウサギ血清とのゲル内沈降反応で特異抗原を示す沈降線がみられなかった（Fig. 8）。また、オートクレーブ菌体抽出液をエタノール・セタブロン分画後電気泳動し酸性多糖の検出を試みたが、変異株には酸性多糖を示す梯子状のバンドが観察されなかった（Fig. 9）。また電子顕微鏡観察では莢膜がみられなかった（Fig. 10）。

特異抗原欠損変異株の染色体 DNA にトランスポゾンが挿入されていることを確認するため、Tn-1 プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、各変異株の染色体 DNA に 1 本のバンドが検出された（Fig. 11）。

2. トランスポゾン挿入隣接配列のシーケンスおよびホモロジー検索

トランスポゾン挿入部位に隣接する *S. iniae* 塩基配列を NCBI の BLASTX プログラムでアミノ酸配列に変換しホモロジー検索を行った結果、6-20、9-16、10-15、11-34、11-36、13-96 の 6 株は、*S. iniae* の莢膜合成遺伝子群 [Accession

no. AY904444] の構成遺伝子のそれぞれ CpsH、ORF276、CpsH、CpsH、CpsM、CpsI と 96 % 以上の高い相同性を示した (Table 2)。6-20、10-15、11-34 は同じ CpsH 遺伝子に挿入されていたが、挿入部位は異なっていた。一方、4-58、4-79、4-94、10-86、11-19 では、それぞれ *S. mutans* の CitG (55 %)、*S. pyogenes* の MtlA (83 %)、*S. agalactiae* の sensor histidine kinase (68 %)、*S. pyogenes* の CBS domain containing protein (79 %)、*S. pyogenes* の adenylosuccinate synthetase (88 %) と最も高い相同性を示した。

第二章 考察

病原細菌の莢膜は病原性因子としてよく知られているが、ヒラメに対する *S. iniae* 莢膜の働きについて十分な研究はなされていない。Kanai ら (2006) はヒラメ由来 *S. iniae* を血清学的性状により K^+ type (莢膜有) と K^- type (莢膜無) に区別し、莢膜がヒラメに対する病原性に関与していることを示唆した。そこで本研究では莢膜を遺伝子レベルで解析するため、 K^+ type の代表株として NUF631 を用い、莢膜が欠損した変異株の作製を試みた。

その結果、約 3,000 コロニーの SM・TC 耐性株が得られた。NUF631 はテトラサイクリンに感受性であるため、SM・TC 耐性株にはテトラサイクリン耐性遺伝子を有するトランスポゾンが伝達されたと推察された。ヒラメ由来 *S. iniae* は血清学的性状により抗 NUF44 (K^- type) FKC ウサギ血清で凝集する K^- type と凝集しない K^+ type に区別できる。そこで抗 NUF44 FKC ウサギ血清に対する凝集性を調べたところ、SM・TC 耐性株 3,000 株中 11 株が凝集を示し (Fig. 7. 2-12)、またこれら 11 株のオートクレーブ菌体抽出液には特異抗原が検出されず (Fig. 8. 2-12)、酸性多糖も検出されなかった (Fig. 9. 2-12)。さらに菌体表層には NUF631 でみられる莢膜様構造物も観察されなかった (Fig. 10. 2-12)。

トランスポゾンの塩基配列から設計したオリゴヌクレオチド (Tn-1) をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、11 株すべての染色体 DNA にトランスポゾンの存在を示すバンドが 1 つ検出された (Fig. 11. 2-12)。このことから変異株染色体 DNA にはトランスポゾンが 1 つ挿入され、

トランスポゾンが挿入された遺伝子のみが変異したと考えられた。したがって、特異抗原、酸性多糖、莢膜には関連性があり、酸性多糖が特異抗原であり莢膜の構成成分になっていると考えられた。また、サザンハイブリダイゼーションで検出されたバンドの塩基数に違いがみられることから、トランスポゾンはそれぞれ異なった塩基配列に挿入されたと推察された。

S. thermophilus では、13 遺伝子により構成される EPS 遺伝子群が莢膜合成に関与している (Stingele *et al.*, 1996)。ヒト由来 *S. iniae* では、転写制御に関する CpsY 遺伝子以下、5 つの機能未知遺伝子を含む 21 遺伝子により構成された遺伝子群が莢膜合成に関与している。トランスポゾン挿入部位の塩基配列から推定されるアミノ酸配列のホモロジー検索を行ったところ、6-20、9-16、10-15、11-34、11-36、13-96 の 6 株はヒト由来 *S. iniae* の莢膜合成遺伝子群の構成遺伝子である CpsH (アミノ酸一致率、99 %)、ORF276 (アミノ酸一致率、96 %)、CpsH (アミノ酸一致率、96 %)、CpsH (アミノ酸一致率、100 %)、CpsM (アミノ酸一致率、97 %)、CpsI (アミノ酸一致率、97 %) とそれぞれ高い相同性を示した。これらのことから、接合伝達により莢膜合成遺伝子にトランスポゾンが挿入されたことによって、莢膜が形成されなかったと思われる。4-94 では *S. agalactiae* の転写制御因子である sensor histidine kinase をコードする遺伝子と高い相同性を示した。したがって CpsY 遺伝子以外にも *S. iniae* の莢膜合成を制御する遺伝子が存在することが示唆された。4-58、4-79、11-19 はそれぞれクエン酸脱離酵素サブユニットとして機能する CitG、リン酸転移酵素システムにおける mannitol-specific enzyme として機能する MtlA、adenylosuccinate synthetase と高い相同性を示したが莢膜合成との関連性は不明であった。これら遺伝子が発現するタンパク質が莢膜合成にどのように関

るかは今後検討すべき点であると思われる。

本章で作製された特異抗原欠損変異株 11 株は莢膜が欠損していたことから、以後、莢膜欠損変異株とした。また、第三章および第四章における実験には、莢膜合成のみが変異したと推定される変異株、すなわち、トランスポゾンが *S. iniae* の莢膜合成遺伝子に挿入された 6-20、9-16、11-36 の 3 株を用いた。

Table 1. Oligonucleotides used for inversed PCR and probe

Oligonucleotide	Sequence	Position in Tn916 sequence (bp)
Tn-1*	5'-GAGGTCATTCTTAGTGGAGAAATCCCTGCTCGGTGT-3'	13842-13877
Tn-5R	5'-TTCTTCGCTGAACGACTTTATCCTCGCCAG-3'	423-394
Tn-10F	5'-CTATCCTACAGCGACAGCCAGTGAAC TTTC-3'	11509-11538
Tn-11F	5'-GTATCGCTGACAGTGGAGTATATCGACCAG-3'	11639-11668
Tn-12R	5'-GCTGGCAGGAATACTTACTTGAATCATGCG-3'	857-828

*Tn-1 was end-labeled with digoxigenin using DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit.

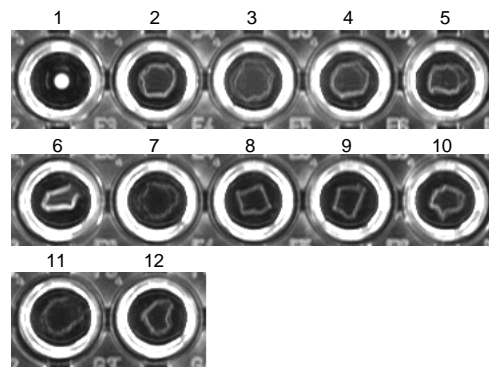


Fig. 7. Agglutination test of *S. iniae* NUF631 and mutant strains. Bacterial cells were mixed with rabbit anti-NUF44 serum. 1, NUF631; 2, 4-58; 3, 4-79; 4, 4-94; 5, 6-20; 6, 9-16; 7, 10-15; 8, 10-86; 9, 11-19; 10, 11-34; 11, 11-36; 12, 13-94.

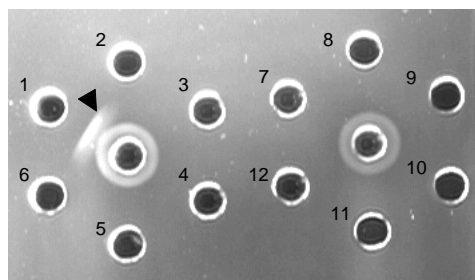


Fig. 8. Immunodiffusion test of autoclave-extracted antigens from *S. iniae* NUF631 and mutant strains. 1-12 are the same as Fig. 7. Center well, rabbit anti-NUF631 serum; Arrow head, K⁺ type-specific antigen.

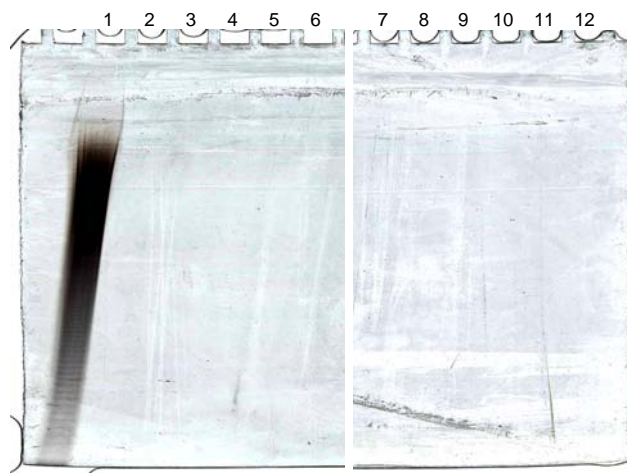


Fig. 9. SE-PAGE of the K⁺ type-specific polysaccharide antigen. Lanes, 1-12 are the same as Fig. 7.

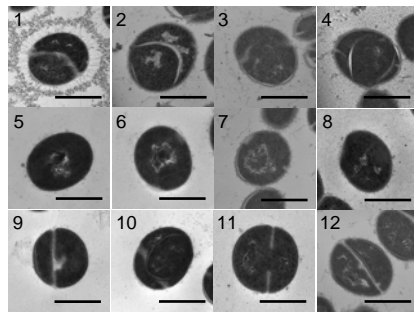


Fig. 10. Transmission electron micrographs of thin sections of *S. iniae* strains stabilized with rabbit anti-NUF631 serum. 1-12 are the same as Fig. 7. Bar = 1 μ m.

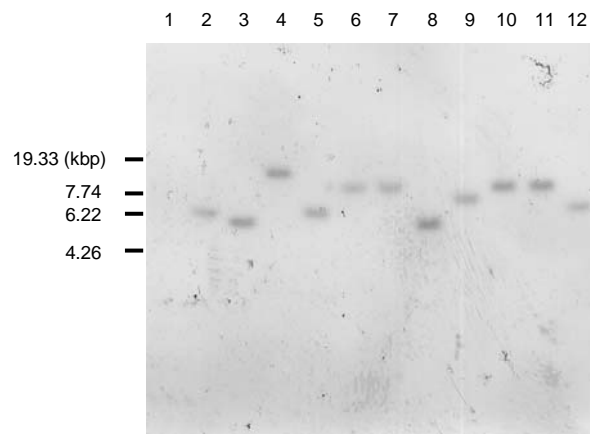


Fig. 11. Southern hybridization of *Hind* III fragments of chromosomal DNAs from *S. iniae* strains with a Tn916 probe (Tn-1). 1-12 are the same as Fig. 7.

Table 2. Homologous proteins to the sequences at Tn916 insertion sites of the *S. iniae* mutant chromosomal DNA

Mutant strain	Homologous protein	Organism	Putative function	Accession number	% Identity */no. of amino acid
4-58	CitG	<i>S. mutans</i>	Citrate metabolism	NP_721406	55/152
4-79	MtlA	<i>S. pyogenes</i>	Mannitol transport	AAT87106	83/154
4-94	Sensor histidine kinase	<i>S. agalactiae</i>	Transcription regulator	NP_689112	68/353
6-20	CpsH	<i>S. iniae</i>	Capsule synthesis	AAY17300	99/340
9-16	ORF276	<i>S. iniae</i>	Capsule synthesis	AAY17304	96/133
10-15	CpsH	<i>S. iniae</i>	Capsule synthesis	AAY17300	96/169
10-86	CBS domain containing protein	<i>S. pyogenes</i>	Unkown	AAT86467	79/117
11-19	Adenylosuccinate synthetase	<i>S. pyogenes</i>	Purine metabolism	AAZ50755	88/59
11-34	CpsH	<i>S. iniae</i>	Capsule synthesis	AAY17300	100/104
11-36	CpsM	<i>S. iniae</i>	Capsule synthesis	AAY17310	97/140
13-96	CpsI	<i>S. iniae</i>	Capsule synthesis	AAY17301	97/96

*Identities were calculated by BLASTX program at the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

第三章 莢膜欠損変異株の病原性

病原細菌の菌体表層には病原性因子が多く存在する。一般に、グラム陽性細菌の莢膜は病原性因子として知られており、宿主食細胞（マクロファージや好中球など）に対して抗貪食作用、抗殺菌作用などの抵抗性を示すことが知られている。魚類において、*L. garvieae* の莢膜保有株は莢膜非保有株と比較してブリに対する病原性が強く、ブリマクロファージに対して抗貪食作用を持つと報告されている（Yoshida *et al.*, 1997）。また、Kanai ら（2006）は K^+ type（莢膜保有株）は K^- type（莢膜非保有株）よりも病原性が強いと報告している。このことから、 K^+ type の莢膜はヒラメに対する重要な病原性因子であることが示唆された。そこで第三章では第二章で作製した莢膜欠損変異株のヒラメに対する病原性およびヒラメマクロファージに対する抗貪食能、抗殺菌能を調べ、貪食刺激によるマクロファージからの活性酸素放出について検討した。

第三章 材料および方法

1. 病原性試験

THA で培養後、PBS に懸濁した NUF631 および莢膜欠損変異株を約 5×10^8 cfu/100 g 魚体重の濃度でヒラメ (103.8 ± 12.6 g) 各 5 尾の体側筋肉に接種した。菌接種魚を 1,000 L パンライト水槽に収容し、無給餌で 10 日間流水飼育した。死亡魚および試験終了後の生残魚から菌の再分離を行った。試験期間中の平均水温は 26.8°C であった。

2. 攻撃菌の魚体内消長

THA で培養した NUF631 および莢膜欠損変異株を PBS に約 10^6 cfu/mL の濃度で懸濁し、ヒラメ (183.9 ± 23.5 g) 各 12 尾の尾柄部血管内に 0.1 mL/100 g 魚体重の割合で接種した。菌接種魚を 1,000 L パンライト水槽に収容し、無給餌で 3 日間飼育した。菌接種 30 分、24、48、72 時間後に接種魚を各 3 尾ずつ取り上げ、尾部血管から採血後腎臓を摘出した。血液は採血後直ちに PBS で 10 倍希釈し、腎臓には 9 倍量の PBS を加えてホモジナイズした後、それぞれ 10 倍階段希釈系列を作製し、各希釈液を THA に 100 μL 塗抹した。2 日間培養後、出現したコロニー数から血液 1 mL または腎臓 1 g あたりの生菌数を求めた。なお、試験期間中の平均水温は 26.0°C であった。

3. ヒラメ血漿中での *S. iniae* の消長

1/10 量のヘパリン溶液 (1,000 unit/mL, 味の素株式会社) を入れた注射器を用いてヒラメ尾部血管から採血し、遠心分離 (1,500 rpm、10 min) して血漿を採取した。THA で培養した NUF631 および莢膜欠損変異株を PBS に約 10^3 cfu/mL の濃度で懸濁し、血漿に 1/10 量加えて 26 °C で培養した。菌液添加時を 0 時間とし、0、3、24 時間後に血漿を 100 μ L ずつ取り THA に塗抹した。2 日間培養後、出現したコロニー数から血漿 1 mL あたりの生菌数を求めた。

4. 菌体の疎水性試験

Rosenberg ら (1980) の方法を一部改変して菌体表面の疎水性を調べた。NUF631 および莢膜欠損変異株を THA で培養した後、PUM バッファー ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 22.2 g、 KH_2PO_4 7.26 g、尿素 1.8 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L 蒸留水、pH 7.1) で 2 回遠心洗浄した。660 nm における吸光値が 0.6 になるよう PUM バッファーに懸濁し菌濃度を調整した。1.16 mL の菌懸濁液に n-ヘキサデカン を 0.04 mL 加え、27 °C で 20 分間インキュベートした後、2 分間激しく攪拌した。15 分間室温で静置した後上澄みを回収し、以下の式で各菌株の疎水率を求めた。100 \times [菌懸濁液の 660 nm における吸光値 - 攪拌後の上澄みの 660 nm における吸光値]/菌懸濁液の 660 nm における吸光値

5. ヒラメ腹腔内マクロファージに対する抵抗性試験

5.1. ヒラメ腹腔内マクロファージおよび新鮮血清の採取

尾部血管から採血し、室温で 2 時間静置して血液を凝固させ、遠心分離 (3,000 rpm、15 min) して新鮮血清を採取した。新鮮血清は使用まで -30°C で保存した。採血後、腹腔内に 40 unit/mL のヘパリンを含む食塩濃度を 1.3 % に調整したダルベッコ PBS (DPBS) を接種して腹部をよくマッサージし、注射器で腹腔内から細胞浮遊液を回収した。53 % パーコール (シグマ) ・ DPBS を遠心分離 (15,000 rpm、1 h) して連続密度勾配を形成した後、細胞浮遊液を重ねし遠心分離 (2,000 rpm、1 h) を行った。形成されたマクロファージ層を注射器で回収し、DPBS で 2 回遠心洗浄 (1,500 rpm、10 min) した。0.1 % トリパンブルー染色で生細胞が 99 % 以上であることを確認し、細胞を 10 % ウシ胎児血清 ・ 0.5 % NaCl 加 RPMI 1640 培地 (RPMI 培地; 日水製薬株式会社) に 2×10^7 cells/mL となるように調整したものをヒラメ腹腔内マクロファージとした。ヒラメ腹腔内マクロファージは試験当日に採取し、使用まで、 27°C 、10 % CO_2 の条件でインキュベートした。

5.2. 食食試験

NUF631 および莢膜欠損変異株を PBS に約 10^9 cfu/mL の濃度で懸濁し、等量の新鮮血清あるいは非働化血清 (46°C で 30 分間保温し補体を不活化した新鮮血清) を混合して 27°C で 20 分間オプソナイズした。ヒラメ腹腔内マクロファージ数と菌数の比率が 1 : 25 となるように両者を混合し、 27°C 、10 % CO_2 の条件で 30 分間インキュベートした。スライドグラスに塗抹標本作製

し、メイ・ギムザ染色を施した後に光学顕微鏡でマクロファージの食菌像を観察した。マクロファージの貪食率はマクロファージ 200 細胞中の菌を取り込んだマクロファージ数の割合で表した (Charland *et al.*, 1996)。

5.3. 細胞内殺菌試験

貪食試験と同様に、NUF631 および莢膜欠損変異株を新鮮血清でオプソナイズした。ヒラメ腹腔内マクロファージ数と菌数の比率が 1 : 100 となるように混合し、27 °C、10 % CO₂ の条件で 30 分間インキュベートした。貪食されなかった細胞外の菌を殺菌するため、ゲンタマイシン (1 mg/mL) を 1/10 量加え、27 °C、10 % CO₂ の条件で 1 時間インキュベートした。マクロファージを 3 回遠心洗浄 (1,000 rpm、20 °C、10 min) し、RPMI 培地に再懸濁した。RPMI 培地に懸濁した時間を 0 時間とし、0、1、2、3 時間後にマクロファージ浮遊液を 100 μL ずつ採取し、9 倍量の滅菌蒸留水に加え氷中で 2 分間静置した。その後激しく攪拌してマクロファージを破壊し、PBS で 10 倍階段希釈系列を作製して各希釈液を THA に 100 μL 塗抹した。2 日間培養後、出現したコロニー数からマクロファージ内生菌数の変化を調べた。

5.4. 活性酸素誘導試験

NUF631 および莢膜欠損変異株をハンクス液 (Hanks' balanced salt solution; HBSS) に約 10⁹ cfu/mL の濃度で懸濁した。菌懸濁液 200 μL に新鮮血清 500 μL を加え、27 °C で 20 分間オプソナイズした。マクロファージ

浮遊液 (2×10^7 cells/mL HBSS) 100 μ L と 40 μ M MCLA (2-Methyl-6-(4-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one, hydrochloride、和光純薬)・HBSS 溶液 100 μ L を OptiPlate-96F (パーキンエルマー) の各ウェルに添加した。プレートを室温で 10 分間静置し、オプソナイズ菌を 20 μ L 加えた。食食刺激によるマクロファージの活性酸素放出量を調べるため、ルミネッセンサー JNR II (アトー株式会社) を用いて 25 分間化学発光を測定した。

第三章 結果

1. 病原性試験

ヒラメに対する莢膜欠損変異株の病原性を Table 3 に示す。NUF631 を接種したヒラメは攻撃後 5 日以内に 5 尾すべて死亡した。莢膜欠損変異株では、11-19 接種区で攻撃後 6 日目と 7 日目に 1 尾ずつ死亡し、死亡魚から K^- type が再分離された。他の莢膜欠損変異株接種区では試験終了の 10 日目まで死亡はみられなかったが、一部の生残魚から K^- type が再分離された。また、NUF631 接種区の死亡魚からは K^+ type が再分離された。NUF631 接種区および 11-19 接種区の死亡魚には口唇や鰭の発赤、腎臓・脾臓の腫脹、肝臓のうっ血などレンサ球菌症の症状が認められた。変異株接種区の生残魚にはこれらの症状はみられなかった。

2. 魚体内および血漿中での菌消長試験

NUF631 接種区では菌接種後 48 時間まで血液および腎臓で生菌数が増加し続け、72 時間後には魚がすべて死亡した (Fig. 12)。一方、6-20、9-16、11-36 接種区では菌接種 24 時間後に腎臓の生菌数が減少した。48 時間後に 6-20、11-36 接種区では生菌数が若干増加したが、接種 30 分後の菌数を上回ることにはなかった。変異株接種区では血液においても 11-36 株接種区の生菌数が若干増加したに過ぎなかった。

血漿中では NUF631 接種区および 6-20、9-16、11-36 接種区ともに生菌数が増加し続け、いずれの増加速度にも有意な差はみられなかった (Fig. 13)。

3. 疎水性試験

NUF631 の n-hexadecane に対する付着率は 8.2 % であったのに対し、6-20、9-16、11-36 の付着率はそれぞれ 78.9 %、85.1 %、86.3 % であり、莢膜欠損変異株の疎水性は NUF631 と比較して高いと考えられた (Fig. 14)。

4. ヒラメ腹腔内マクロファージ抵抗性試験

Fig. 15 に貪食試験の結果を示す。新鮮血清でオプソナイズした NUF631 の貪食率が 9.7 % であったのに対して 6-20、9-16、11-36 の貪食率はそれぞれ 39.8 %、43.4 %、37.3 % であり、NUF631 と莢膜欠損変異株の間に有意な差がみられた。また、非働化血清でオプソナイズした場合、NUF631 および莢膜欠損変異株とも非働化しなかった血清でオプソナイズした場合と比べて貪食率が低かった (Fig. 16)。

Fig. 17 にヒラメ腹腔内マクロファージ細胞内での *S. iniae* の生菌数変化を示す。NUF631 は 3 時間まで生菌数が増加し続け測定開始の約 1.8 倍になった。一方、莢膜欠損変異株では 3 時間で細胞内生菌数が半減し、NUF631 と莢膜欠損変異株の間に有意な差が認められた。

Fig. 18 に *S. iniae* の貪食刺激に対するヒラメ腹腔内マクロファージの活性酸素放出量を化学発光で示した。新鮮血清でオプソナイズした 6-20、9-16、

11-36 を貪食した場合の化学発光量は、NUF631 を貪食した場合よりも多く、NUF631 と莢膜欠損変異株の間に有意な差が認められた。

第三章 考察

1. 莢膜欠損変異株の病原性

ヒラメに対する病原性試験において、NUF631 を接種したヒラメは 5 日以内に 5 尾すべて死亡した (Table 3)。NUF631 接種区ではすべての死亡魚から K^+ type が再分離され、レンサ球菌症に特徴的な症状が顕著に観察されたことから、死亡原因は *S. iniae* の感染によるものと考えられた。一方、莢膜欠損変異株では、11 株のうち 11-19 接種区以外、菌接種後 10 日経過してもヒラメの死亡はみられなかった。莢膜欠損変異株接種区の生残魚からは K^- type が再分離された。11-19 接種区では 2 尾死亡し、死亡魚には腎臓や肝臓の腫脹、腹水の貯留などが観察され、 K^- type が分離された。11-19 接種区においてヒラメの死亡原因は *S. iniae* の感染によるものと考えられた。*L. garvieae* では莢膜保有菌株は莢膜非保有株と比べてブリに対して毒力が強く、莢膜が病原性因子であることが示唆されている (Kitao, 1982; Yoshida *et al.*, 1997)。*S. iniae* においても、莢膜の欠損した変異株は病原性が低下したため、莢膜はヒラメに対して重要な病原性因子であると考えられる。

NUF631 および莢膜欠損変異株のヒラメ体内における生菌数の増減を測定したところ、NUF631 では腎臓および血液の生菌数が増加し続けた (Fig. 12)。一方、6-20、9-16、11-36 では、腎臓で生菌数が減少する傾向がみられた。また NUF631 および莢膜欠損変異株は、接種 30 分後に血液より腎臓の生菌数が多かった。このことから、魚体内に侵入した菌は血管内を移動して腎臓組織などに

取り込まれると考えられた。魚類の腎臓や脾臓には多くの食細胞が認められ、Nguyen ら（2001）は人為感染させた *S. iniae* がヒラメの腎臓および脾臓のマクロファージに取り込まれることを報告している。血漿中での生菌数の増減を調べたところ、NUF631 および莢膜欠損変異株ともに増加し、両者の生菌数増加率に有意な差は認められなかった（Fig. 13）。このことから、*S. iniae* は血液中の補体などの殺菌作用は受けにくいことが示唆された。したがって、NUF631 および莢膜欠損変異株は血液中で殺菌されないまま腎臓などに到達した後マクロファージ等の食細胞に貪食され、NUF631 は殺菌に抵抗し、莢膜欠損変異株は殺菌されることが考えられた。すなわち、NUF631 は莢膜を有することでマクロファージの殺菌作用に抵抗し、強い病原性を獲得していると推察された。

2. ヒラメ腹腔内マクロファージの貪食作用に対する莢膜の役割

新鮮血清でオプソナイズした NUF631 および莢膜欠損変異株をヒラメ腹腔内マクロファージに貪食させたところ、莢膜欠損変異株は NUF631 よりも貪食されやすかった（Fig. 15）。また非働化したヒラメ血清で莢膜欠損変異株をオプソナイズすると、貪食率が低下した（Fig. 16）。これらのことから、莢膜欠損変異株は NUF631 よりもヒラメ腹腔内マクロファージに貪食されやすく、莢膜欠損変異株の貪食には補体のオプソニンとしての働きが必要であると考えられた。マクロファージに取込まれた後、NUF631 は細胞内で増殖したのに対して莢膜欠損変異株は減少した（Fig. 17）。また NUF631 はマクロファージの活性酸素放出を誘導しなかったのに対して莢膜欠損変異株は誘導した（Fig. 18）。これらのことから NUF631 は莢膜を有するために、ヒラメ腹腔内マクロファ

ジに取込まれた後も活性酸素の放出を阻害することで殺菌を免れ、細胞内で増殖すると考えられた。

食細胞による殺菌の第一ステップは病原体の取り込みである。莢膜を有する病原細菌では、莢膜が欠損するとマクロファージや好中球に効率よく貪食されることが知られている。Charland ら (1998) は、*S. suis* の莢膜欠損変異株は莢膜保有株と比べて、ブタの食細胞に貪食されやすいと報告している。魚類でも、Yoshida ら (1996b) は *Streptococcus sp.* (*S. iniae* のシノニム) において、莢膜非保有株は莢膜保有株に比べてニジマスの腎臓マクロファージに貪食されやすいと報告している。本研究においても、莢膜欠損変異株は NUF631 よりも貪食されやすかった。これらのことから、*S. iniae* の莢膜はヒラメ腹腔内マクロファージの食作用に対する抵抗性因子であると考えられた。莢膜の貪食回避における役割として、以下のような 2 つの仮説が挙げられる。1 つ目は補体と菌体の結合阻害である。Fig. 10-1 のように莢膜は厚い層を形成する。このことから莢膜は菌体を外環境から隔離することで補体との結合を阻害すると推測された。2 つ目は補体と食細胞上の補体レセプターの結合阻害である。Winkelstein ら (1980) は、補体副経路で活性化された C3b (補体第 3 成分) は肺炎双球菌の莢膜保有株および莢膜非保有株のどちらの菌体表層にも結合すると報告している。本研究においては、非働化したヒラメ血清でオプソナイズすると莢膜欠損変異株の貪食率が低下した。これらのことから莢膜欠損変異株の菌体表層には補体が結合し、補体と補体レセプターが結合することで貪食が促進されたと推測された。一方、NUF631 では、補体が菌体表層に結合しても補体が厚い莢膜に埋もれてしまい、補体と補体レセプターの結合が阻害されている可能性が考えられる。

ヒラメ腹腔内マクロファージに取込まれた後、莢膜欠損変異株はヒラメ腹腔内マクロファージの活性酸素放出を誘導するが、NUF631 は誘導しなかった。活性酸素はマクロファージの殺菌物質として重要である。NUF631 はこの活性酸素の放出を抑えることにより細胞内で殺菌されないと思われた。豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) では、マウス新鮮血清でオプソナイズした莢膜欠損変異株はマウス腹腔内マクロファージ内で減少し、活性酸素放出を誘導するが、親株は細胞内で増殖し、活性酸素放出を誘導しないと報告されている (Shimoji *et al.*, 1996)。Shimoji ら (1996) は、両者とも補体を介して貪食されるが補体レセプターが異なり、親株を取り込む場合の補体レセプターでは活性酸素放出を誘導しないと考えている。*S. iniae* においても、NUF631 と莢膜欠損変異株ではヒラメ腹腔内マクロファージの活性酸素放出量に違いがみられた。したがって、貪食の際のレセプターの違いが活性酸素の放出誘導を決定しており、その後の細胞内における *S. iniae* の生死を左右しているのかもしれない。

3. ヒラメ腹腔内マクロファージの食作用に対する抵抗性と疎水性の関係

S. iniae の疎水性を調べたところ、莢膜欠損変異株は NUF631 より疎水性であり、ヒラメ腹腔内マクロファージに貪食されやすかった (Fig. 14)。Absolom (1988) も、疎水性の菌は親水性の菌よりもヒト好中球に貪食されやすいと報告している。このことから、NUF631 が親水性であることもマクロファージの食作用からの回避に関与している可能性がある。

Table 3. Virulence of *S. iniae* NUF631 and capsule-deleted mutants in Japanese flounder

Strain	Virulence ^{*1}	Recovery of K ⁻ type ^{*2} cells from survivor
NUF631	5/5	-
4-58	0/5	2/5
4-79	0/5	2/5
4-94	0/5	2/5
6-20	0/5	0/5
9-16	0/5	0/5
10-15	0/5	1/5
10-86	0/5	3/5
11-19	2/5	3/3
11-34	0/5	1/5
11-36	0/5	0/5
13-94	0/5	2/5

^{*1}, number of dead fish/number of challenged fish;

^{*2}, number of K⁻ type recovered fish/number of survivor.

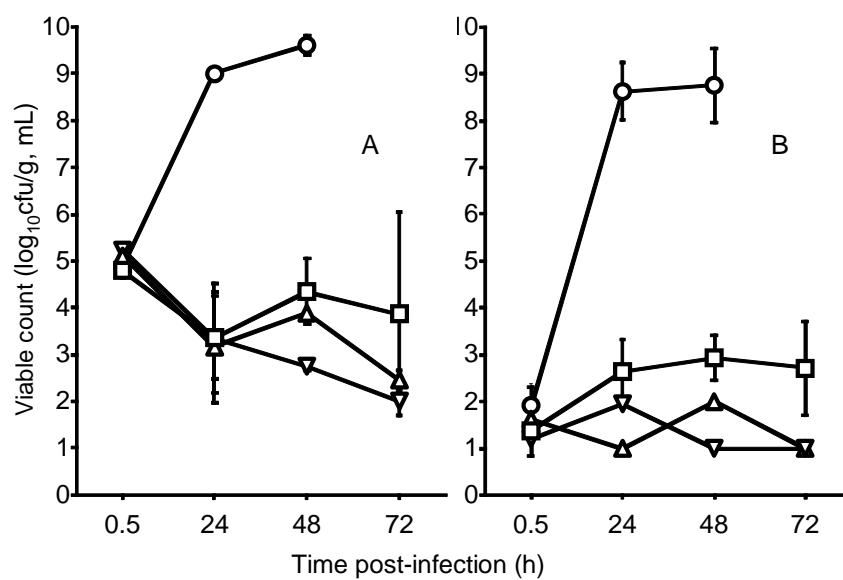


Fig. 12. Changes in viable count of intravenously inoculated *S. iniae* NUF631 and mutant strains in the kidney (A) and blood (B) of Japanese flounder. Bars represent standard deviations (n = 3). O, NUF631; Δ , 6-20; ∇ , 9-16; \square , 11-36.

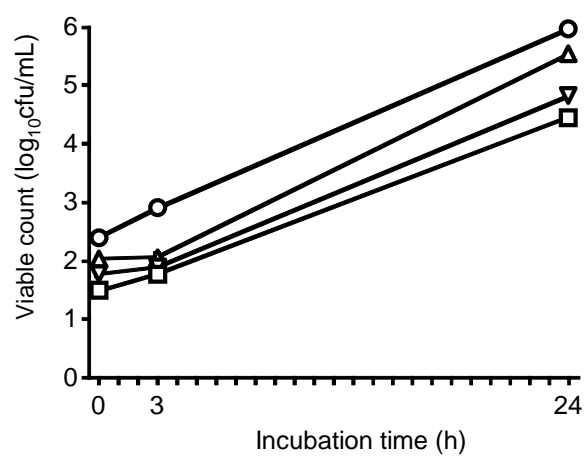


Fig. 13. Viability of *S. iniae* NUF631 and mutant strains in Japanese flounder plasma. O, NUF631; Δ , 6-20; ∇ , 9-16; \square , 11-36.

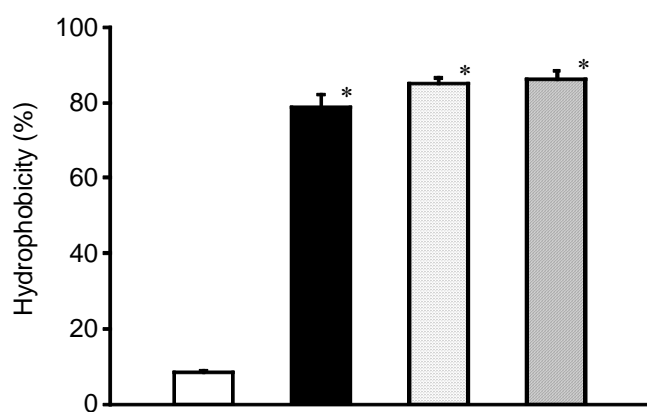


Fig. 14. Hydrophobicity of *S. iniae* NUF631 and mutant strains. Values that are significantly different ($p < 0.01$) from the NUF631 value are indicated by an asterisk. Bars represent standard deviations ($n = 3$). □, NUF631; ■, 6-20; □, 9-16; ▨, 11-36.

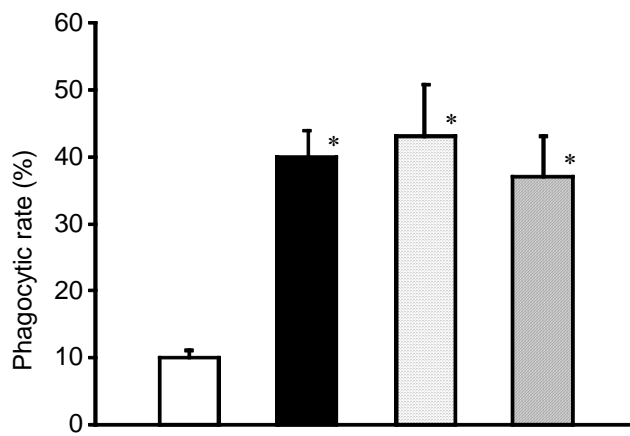


Fig. 15. Phagocytosis of *S. iniae* NUF631 and mutant strains by flounder peritoneal macrophages. Values that are significantly different ($p < 0.01$) from the NUF631 value are indicated by an asterisk. Bars represent standard deviations ($n = 3$). □, NUF631; ■, 6-20; □, 9-16; ▨, 11-36.

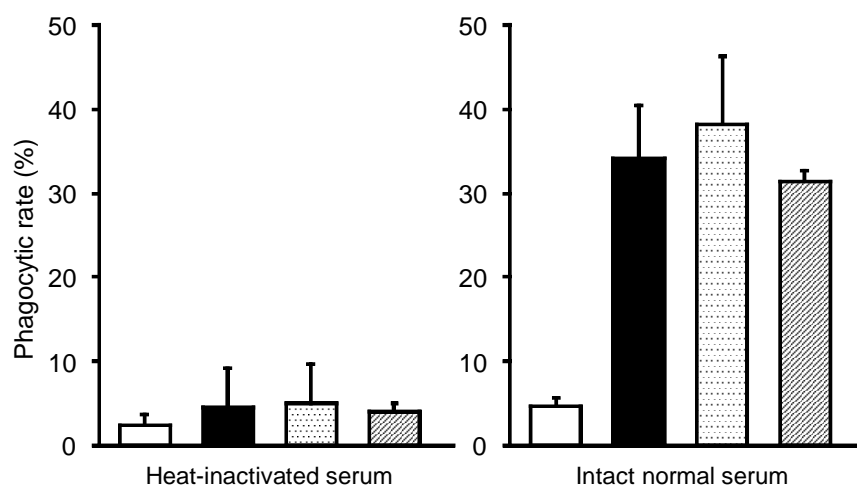


Fig. 16. Phagocytosis by flounder peritoneal macrophages of *S. iniae* NUF631 and mutant strains opsonized with intact and heat-inactivated flounder normal sera. □, NUF631; ■, 6-20; ▤, 9-16; ▨, 11-36.

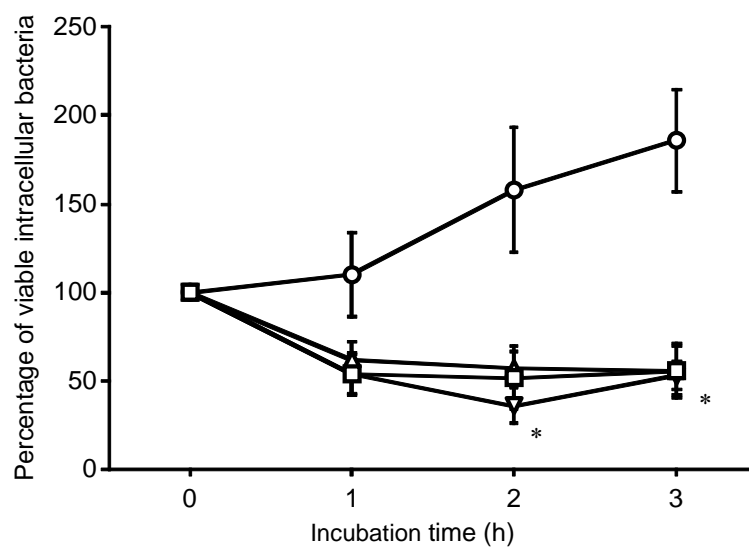


Fig. 17. Intracellular survival of *S. iniae* NUF631 and mutant strains within flounder peritoneal macrophages. Values that are significantly different ($p < 0.01$) from the NUF631 value are indicated by an asterisk. ○, NUF631; △, 6-20; ▽, 9-16; □, 11-36.

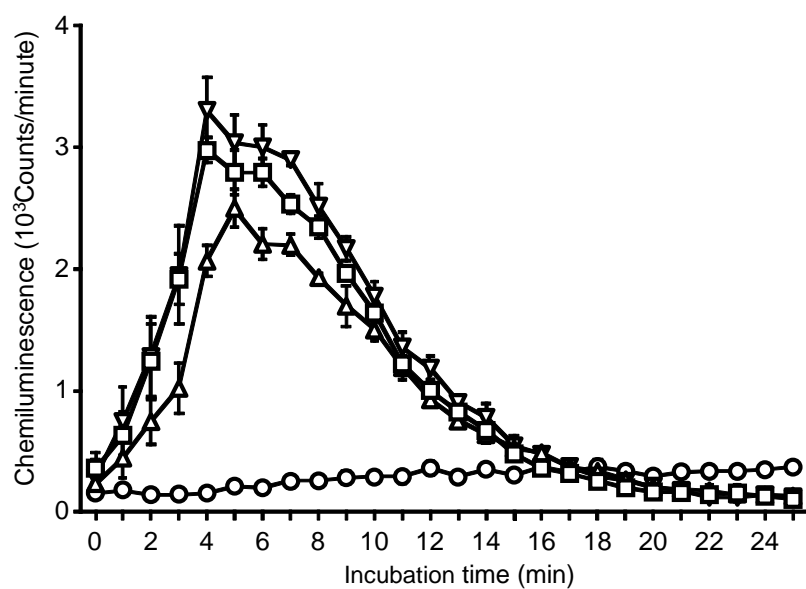


Fig. 18. Chemiluminescence response of flounder peritoneal macrophages to *S. iniae* NUF631 and mutant strains opsonized with flounder normal serum. O, NUF631; Δ, 6-20; ▽, 9-16; □, 11-36.

第四章 莢膜欠損変異株の免疫原性

現在、ヒラメレンサ球菌症の治療には塩酸オキシテトラサイクリンが使用されているが、薬剤の残留や耐性菌の発生が問題となるため、特異的生体防御機構を利用したワクチンによる予防法の確立が求められている。しかし、ワクチン開発の基礎となる *S. iniae* の免疫原性に関する研究は少ない。

第三章において、NUF631 は莢膜が欠損すると、ヒラメ腹腔内マクロファージに対する抗食食性・抗殺菌性が低下し、ヒラメに対する病原性が失われることを述べた。このように病原細菌の菌体表層には、病原性因子として重要な役割を担うファクターが存在する。莢膜は病原性因子として多くの病原細菌で知られているが、肺炎球菌 (Artz *et al.*, 2003)、ブドウ球菌 (O' Riordan and Lee, 2004)、髄膜炎菌 (Lindahl *et al.*, 2005)、B 群レンサ球菌 (Harrison, 2006) では特異的生体防御における重要な防御抗原としても知られている。

Kanai ら (2006) はヒラメを K^+ type (強毒株) のホルマリン不活化菌体 (K^+ type FKC) で免疫すると強毒株の攻撃に対して防御効果が得られるが、 K^- type (弱毒株) FKC で免疫しても防御効果は得られなかったと報告している。第一章では K^+ type 莢膜の構成成分と推定される粗精製特異抗原による免疫試験において、若干の免疫効果が得られたことを述べた (Fig. 6)。このことから莢膜は *S. iniae* の病原因子としてだけでなく、重要な防御抗原である可能性が示唆された。そこで第四章では NUF631 と莢膜欠損変異株の FKC を作製し、ヒラメに対する莢膜の防御抗原としての役割について検討した。

第四章 材料および方法

1. 免疫効果試験

1.1 *S. iniae* FKC の調製

NUF631 および莢膜欠損変異株 (4-58、4-79、4-94、6-20、10-15、10-86、11-34、11-36) の FKC 作製方法は第一章 8.1. に従った。

1.2. 免疫方法

NUF631 FKC および莢膜欠損変異株 FKC を PBS に 4 mg/mL の濃度で懸濁し、ヒラメ (127.2 ± 19.2 g) 15 尾に 0.5 mL/100 g 魚体重の割合で腹腔内接種した。対照区には PBS を接種した。試験区ごとにフィンカットで標識し、1,000 L パンライト水槽に収容して給餌しながら 2 週間流水飼育した。試験期間中の平均水温は 25.5 °C であった。

1.3. 攻撃方法およびヒラメ抗血清の採取

NUF631 を THA に接種し 27 °C で 18 時間培養後、PBS に約 10^{10} cfu/mL の濃度で懸濁した。菌懸濁液を 0.1 mL/100 g 魚体重の割合で各 FKC 接種魚 10 尾の体側筋肉に接種し、1,000 L パンライト水槽に収容し、無給餌で 2 週間流

水飼育した。死亡魚および試験終了後の生残魚から菌の再分離を行った。残りの各 FKC 接種魚 5 尾については尾部血管から採血し、室温で 2 時間静置して血液を凝固させ、遠心分離 (3,000 rpm、15 min) して血清を採取した。試験期間中の平均水温は 26.3 °C であった。

2. 免疫魚体内での菌の消長試験

2.1. 免疫方法

NUF631 FKC および 6-20 FKC を PBS に 4 mg/mL の濃度で懸濁し、ヒラメ (418.8 ± 86.7 g) 9 尾に 0.5 mL/100 g の割合で腹腔内接種した。また対照区には PBS を接種した。試験区ごとにフィンカットで標識し、1,000 L パンライト水槽に収容して給餌しながら 2 週間流水飼育した。試験期間中の平均水温は 26.1 °C であった。

2.2. 攻撃方法

NUF631 を THA に接種し 27 °C で 18 時間培養後、PBS に約 10^6 cfu/mL の濃度で懸濁した。菌懸濁液を 0.1 mL/100 g 魚体重の割合で各試験魚 9 尾の尾部血管内に接種し、30 分、24、72 時間後に接種魚をそれぞれ 3 尾取り上げ、尾部血管から採血後腎臓を摘出した。血液は採血後直ちに PBS で 10 倍希釈し、腎臓には 9 倍量の PBS を加えてホモジナイズした後、それぞれ 10 倍階段希釈系列を作製し、各希釈液を THA に 100 μ L 塗抹した。2 日間培養後、出現

したコロニー数から血液 1 mL または腎臓 1 g あたりの生菌数を求めた。なお、試験期間中の平均水温は 26.0 °C であった。

3. 免疫血漿中での攻撃菌の消長

第四章 2.1. と同様の方法で NUF631 FKC および 6-20 FKC で免疫したヒラメの尾柄部血管から 1/10 量のヘパリン溶液 (1,000 unit/mL, 味の素株式会社) を入れた注射器を用いて採血し、遠心分離 (1,500 rpm、10 min) して血漿を採取した。非免疫魚からも同様の方法で血漿を採取した。THA で培養した NUF631 を PBS に約 10^5 cfu/mL の濃度で懸濁し、血漿に 1/10 量加えて 27 °C で培養した。菌液添加時を 0 時間とし、0、3、6 時間後に血漿を 100 μ L ずつ取り THA に塗抹した。2 日間培養後、出現したコロニー数から血漿 1 mL あたりの生菌数を求めた。

4. ヒラメ腹腔内マクロファージに対する抵抗性試験

4.1. ヒラメ腹腔内マクロファージおよびヒラメ抗血清

ヒラメ腹腔内マクロファージは第三章 5.1. の方法に従って無処理のヒラメから採取し、採取当日に使用した。第四章 1.3. の方法に従い、NUF631 FKC および 6-20 FKC で免疫したヒラメの尾部血管から採血し、室温で 2 時間静置して血液を凝固させ、遠心分離 (3,000 rpm、15 min) してヒラメ抗血清を採取した。ヒラメ抗血清は試験当日まで -30 °C で保存した。

4. 2. 食食試験

NUF631 および 6-20 を PBS に約 10^9 cfu/mL の濃度で懸濁し、等量の抗 NUF631 FKC ヒラメ血清、抗 6-20 FKC ヒラメ血清あるいは新鮮血清と混合して 27 °C で 20 分間オプソナイズした。各オプソナイズ菌に対するヒラメ腹腔内マクロファージの食食および食食率算出方法は第三章 5. 2. に従った。

4. 3. 活性酸素誘導能試験

NUF631 および 6-20 を HBSS に約 2.5×10^9 cfu/mL の濃度で懸濁し、菌懸濁液 200 μ L に抗 NUF631 FKC ヒラメ血清、抗 6-20 FKC ヒラメ血清あるいは新鮮血清 500 μ L を加え 27 °C、20 分間オプソナイズした。各オプソナイズ菌に対するヒラメ腹腔内マクロファージの活性酸素放出量測定方法は第三章 5. 4. に従った。

5. ヒラメ血清で処理した菌体表層の電子顕微鏡観察

ヒラメ血清で処理した *S. iniae* の菌体表層を JEM-100S 透過型電子顕微鏡（日本電子）で観察した。NUF631 および 6-20 を 27 °C で 18 時間培養した後 PBS に懸濁した。それぞれ抗 NUF631 FKC ヒラメ血清、抗 6-20 FKC ヒラメ血清あるいは新鮮血清と室温で 1 時間反応させた後、4 °C で 3 時間静置した。その後の試料作製方法は第二章 7. に従った。

6. 菌体表層に結合した血清成分の検出

6.1. 菌体表層に結合した血清成分の遊離方法

マイクロチューブ内で NUF631 および 6-20 (100 mg/mL PBS) 100 μ L に抗 NUF631 FKC ヒラメ血清、抗 6-20 FKC ヒラメ血清あるいは新鮮血清を 400 μ L 加え 27 $^{\circ}$ C で 30 分間放置した後、菌液を水中で冷却した。菌体を PBS で 3 回遠心洗浄 (10,000 rpm、30 sec) して非付着成分を除去した後、菌体に 1 % CHAPS \cdot PBS を 80 μ L 加えて懸濁し、27 $^{\circ}$ C で 10 分間置いて菌体表層に付着した血清成分を遊離させた。菌懸濁液を遠心分離 (10,000 rpm、30 sec) して上澄みを回収し使用まで 4 $^{\circ}$ C で保存した。

6.2. 菌体遊離成分の電気泳動およびウェスタンブロッティング

作製した各試料を Laemmli (1970) の方法に従い SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) した。アクリルアミドの濃度は濃縮ゲル 4 %、分離ゲル 10 % とした。泳動後、ゲルを Coomassie Brilliant Blue R 250 (CBB、シグマ) で染色した。また、菌体表層に結合した血清成分からヒラメ抗体を検出するために、Towbin ら (1979) の方法に従い、SDS-PAGE 後のゲルをトランスファーバッファー (100 mM Tris、192 mM glycine、20 % methanol) で平衡化し、PVDF 膜 (Clear Blot Membrane-P、アトー株式会社) に転写した。転写後の膜を 20 mM Tris、500 mM NaCl (pH 7.5、TBS) に浸した後、ゼラチンを

含む同緩衝液で 1 時間ブロッキングした。次に、0.05 % Tween 20 を含む TBS (TTBS) で洗浄後、1 % ゼラチンを含む TTBS で 400 倍に希釈した抗ヒラメ抗体ウサギ血清中で 2 時間反応させた。TTBS で 3 回洗浄し、同緩衝液で 3,000 倍に希釈したヤギ抗ウサギ IgG ・ HRP (バイオ ・ ラッド) 中で 2 時間反応させた。TTBS で洗浄後、0.02 % DAB (和光純薬) ・ 0.005 % 過酸化水素 ・ 50 mM Tris-HCl (pH7.6) に浸し、抗体と反応したバンドを検出した。

第四章 結果

1. 免疫効果試験

NUF631 FKC および莢膜欠損変異株 FKC で免疫したヒラメを NUF631 で攻撃した時の死亡率および免疫魚の凝集抗体価を Table 4 に示す。NUF631 FKC で免疫したヒラメは NUF631 攻撃後 14 日以内に 10 尾中 2 尾死亡したのに対して、変異株 FKC で免疫したヒラメは 4-58、4-79 FKC 免疫区では 10 尾すべて、4-94、10-15、10-86、11-34、11-36 FKC 免疫区では 9 尾、6-20 FKC 免疫区では 8 尾死亡した。また、すべての死亡魚からは K^+ type が再分離され、死亡魚の症状として、病原性試験と同様に、口唇や鰭の発赤、腎臓・脾臓の腫大、肝臓のうっ血などがみられた。抗莢膜欠損変異株 FKC ヒラメ血清は K^- type FKC と高い凝集抗体価を示したが、 K^+ type FKC に対する凝集抗体価は検出されなかった。抗 NUF631 FKC ヒラメ血清は K^- type FKC と高い凝集抗体価を示し、 K^+ type FKC とともに低いながら凝集反応を示した。

2. 免疫魚体内および血漿中での菌消長試験

6-20 FKC 免疫区および対照区では菌接種 72 時間後まで腎臓および血液中で生菌数が増加し続けた (Fig. 19)。一方、NUF631 FKC 免疫区では腎臓および血液中で菌接種 24 時間後まで若干生菌数の増加が見られたが、72 時間後には減少した。特に腎臓中では 24 時間以降顕著な減少傾向がみられた。

各免疫血漿中では NUF631 FKC 免疫区および 6-20 FKC 免疫区ともに時間経過と共に生菌数の増加がみられ、双方に有意な差はみられなかった (Fig. 20)。

3. ヒラメ腹腔内マクロファージ抵抗性試験

Fig. 21 に食食試験の結果を示す。抗 NUF631 FKC ヒラメ血清でオプソナイズした NUF631 の食食率は 41 % であったのに対して抗 6-20 FKC ヒラメ血清およびノーマル血清でオプソナイズした NUF631 の食食率はそれぞれ 4.2 %、2.0 % であった。抗 NUF631 FKC ヒラメ血清でオプソナイズした場合とノーマル血清でオプソナイズした場合の間に有意な差がみられた ($p < 0.01$) が、抗 6-20 FKC ヒラメ血清でオプソナイズした場合とノーマル血清でオプソナイズした場合の間に有意な差はみられなかった。一方、6-20 の食食率は抗 NUF631 FKC ヒラメ血清でオプソナイズした場合、45.1 % であったのに対して抗 6-20 FKC ヒラメ血清およびノーマル血清でオプソナイズした場合はそれぞれ 39.9 %、37.5 % であり、どの血清でオプソナイズしても食食率は高かった。

Fig. 22 に免疫血清でオプソナイズした *S. iniae* 食食刺激によるヒラメ腹腔内マクロファージの活性酸素放出量を示す。ヒラメ腹腔内マクロファージが放出した活性酸素を化学発光で検出したところ、各血清でオプソナイズした NUF631 の食食刺激による活性酸素放出量は、抗 NUF631 FKC ヒラメ血清区で 5.92×10^3 counts であるのに対して抗 6-20 FKC ヒラメ血清区、ノーマル血清区では 0.25×10^3 counts および 0.17×10^3 counts であった。抗 NUF631 FKC ヒラメ血清区とノーマル血清区の間に有意な差がみられた ($p < 0.01$) が、抗 6-20 FKC ヒラメ血清区とノーマル血清区の間に有意な差はみられなかった。一方、

6-20 の食食刺激による活性酸素放出量は、抗 NUF631 FKC ヒラメ血清区で 5.86×10^3 counts、抗 6-20 FKC ヒラメ血清区、ノーマル血清区では 4.33×10^3 counts および 2.55×10^3 counts であり 6-20 はどの免疫血清でオプソナイズしても高い活性酸素放出量を示した。

4. ヒラメ免疫血清処理菌の菌体表層電子顕微鏡観察

NUF631 に抗 NUF631 FKC ヒラメ血清を反応させると莢膜層に電子密度の高い物質が観察された (Fig. 23-2)。しかし、ノーマル血清および抗 6-20 FKC ヒラメ血清を反応させても血清成分の結合は観察されなかった (Fig. 23-1、3)。一方、6-20 に抗 NUF631 FKC ヒラメ血清および抗 6-20 FKC ヒラメ血清を反応させると菌体表面に電子密度の高い物質が観察された (Fig. 23-5、6)。

5. 菌体表層に結合したヒラメ抗体の検出

Fig. 24 に実験結果を示す。A は菌体表層に結合した各ヒラメ血清成分の SDS-PAGE 像、B は電気泳動後抗ヒラメ抗体ウサギ血清でウェスタンブロットしたものである。NUF631 では抗 NUF631 FKC ヒラメ血清で処理した場合、6-20 では抗 NUF631 FKC ヒラメ血清および抗 6-20 FKC ヒラメ血清で処理した場合に、菌体表層遊離成分から約 70 kDa の位置にバンドが検出された。

第四章 考察

本章では莢膜の防御抗原としての役割を明らかにするため、NUF631 と莢膜欠損変異株から FKc を作製し強毒株 (NUF631) に対する免疫効果を検討した。その結果、NUF631 FKc で免疫した場合 NUF631 に対して防御効果が認められ (Table 4)、莢膜欠損変異株 FKc では防御効果は得られなかった。このことから、NUF631 FKc で免疫されたヒラメは莢膜抗原に対して特異的に免疫応答し、これが免疫防御に働くと考えられた。*E. seriolocida* (*L. garvieae* のシノニム) の FKc で免疫したブリの血清には、*E. seriolocida* に対する殺菌活性が認められるとされており、*E. seriolocida* に対する免疫防御に抗体や補体などの液性因子が関与していると考えられている (Kusuda *et al.*, 1996)。一方で、*S. iniae* の FKc で免疫したニジマスでは血清の殺菌活性は認められず、免疫魚の感染防御に血清成分は関与しないと報告されている (Sakai *et al.*, 1989)。本研究でも、NUF631 は抗 NUF631 FKc および抗 6-20 FKc ヒラメ血漿中で生菌数が増加したことから、*S. iniae* は補体の古典経路や代替経路による殺菌を受けにくいことが示唆された (Fig. 20)。また、NUF631 FKc 免疫魚の腎臓中で生菌数が顕著に減少したことから (Fig. 19)、NUF631 の殺菌には食細胞の殺菌作用が重要であると考えられた。

哺乳類では特異的生体防御において、好中球やマクロファージによる食菌および殺菌作用に抗体や補体が重要な役割を果たしている。Kusuda ら (1988) は *Streptococcus sp.* (*L. garvieae* のシノニム) のホルマリン死菌で免疫したブリの特異抗体はブリマクロファージの貪食率を高め、特異抗体の存在下で補体

が貪食活性を著しく促進すると報告している。そこで免疫血清のオプソナイズ効果が食細胞の貪食活性に与える影響を調べるため、各免疫血清でオプソナイズされた NUF631 および莢膜欠損変異株に対するヒラメ腹腔内マクロファージの貪食能と活性酸素放出能を検討した。その結果、NUF631 は抗 NUF631 FKC ヒラメ血清でオプソナイズした場合のみ貪食率と活性酸素誘導能が高まったが、抗 6-20 FKC ヒラメ血清でオプソナイズした NUF631 ではこれら活性が低かった (Fig. 21、22)。ブリでは、*L. garvieae* 莢膜保有株 FKC 免疫血清は莢膜保有株に対して凝集抗体価は認められるが非常に低いと報告されている (Yoshida *et al.*, 1996a; Ooyama *et al.*, 1999)。本研究においても抗 NUF631 FKC ヒラメ血清は NUF631 FKC (K⁺ type) と低いながら凝集を示した (1.75 ± 0.5) が、6-20 FKC ヒラメ血清は凝集しなかった (<1) (Table 4)。このことから、抗 NUF631 FKC ヒラメ血清中の莢膜に対する特異抗体が NUF631 の菌体表層に結合し、オプソニンとして働いたことでヒラメ腹腔内マクロファージの食作用が促進されたのではないかと推察された。

そこで、莢膜に対するヒラメ抗体が NUF631 菌体表層に結合していることを確認するため電子顕微鏡で菌体表層を観察した。その結果、抗 NUF631 FKC ヒラメ血清で前処理した NUF631 の菌体表層に電子密度の高い物質が観察された (Fig. 23)。また、各免疫血清中の NUF631 および 6-20 菌体結合成分を電気泳動し、ウエスタンブロットしたところ、抗 NUF631 FKC ヒラメ血清中の NUF631 および 6-20 菌体結合成分と抗 6-20 FKC ヒラメ血清中の 6-20 菌体結合成分からヒラメ抗体のヘビーチェーンと思われる約 70 kDa のタンパク質が検出された (Fig. 24)。しかし、6-20 ではヒラメ抗体は菌体表面に結合しているのに対して NUF631 では抗体は菌体を取り囲む莢膜の表面に結合していた (Fig.

23)。このことから抗 NUF631 FKc ヒラメ血清で NUF631 をオプソナイズすると莢膜に対する特異抗体が NUF631 に結合すると考えられた。以上のことから、NUF631 FKc でヒラメを免疫すると、NUF631 に対する高い免疫効果が得られるのは、抗莢膜特異抗体が NUF631 の菌体表層に結合し、ヒラメ腹腔内マクロファージの食作用および活性酸素産生を亢進するからであると考えられた。よって、*S. iniae* の莢膜は *S. iniae* に対する感染防御において重要な防御抗原であることが示唆された。

Table 4. Efficacy of FKC vaccines in artificial infection with *S. iniae* NUF631

FKC	Fish mortality after challenge	Agglutinating titre *	
		(K ⁻ type)	(K ⁺ type)
NUF631	2/10	8.0	1.8±0.5
4-58	10/10	8.5±2.4	<1
4-79	10/10	5.5±4.8	<1
4-94	9/10	7.3±3.0	<1
6-20	8/10	8.0	<1
10-15	9/10	8.3±0.5	<1
10-86	9/10	8.0	<1
11-34	9/10	9.8±1.7	<1
11-36	9/10	8.5±1.0	<1
Non-immunized	10/10	<1	<1

*, Agglutinating titre (Log₂) of sera from vaccinated fish against K⁻ type and K⁺ type cells.

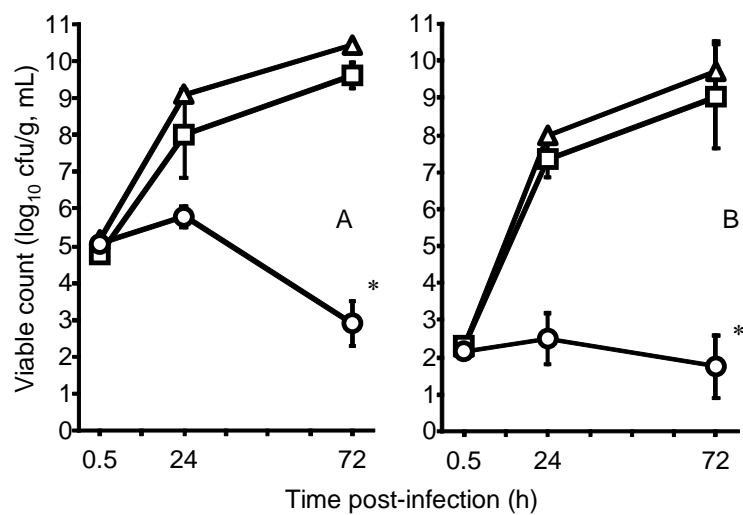


Fig. 19. Changes in viable count of *S. iniae* NUF631 in the kidney (A) and blood (B) of Japanese flounder. Bars represent standard deviations (n = 3). Values that are significantly different (p < 0.01) from the non-immunized fish value are indicated by an asterisk. O, fish immunized with NUF631 FK; □, fish immunized with 6-20 FK; Δ, non-immunized fish.

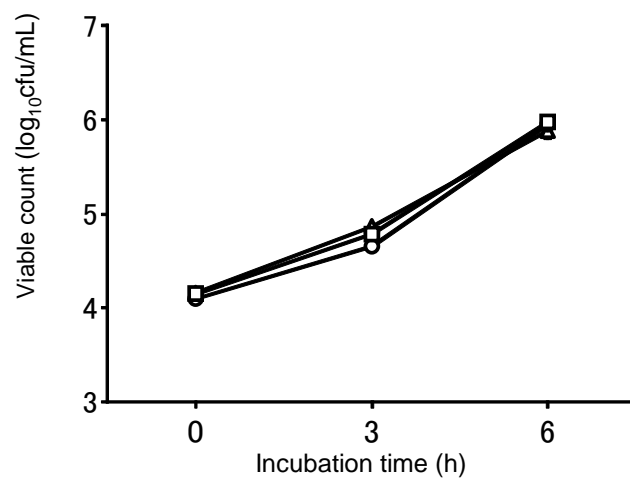


Fig. 20. Viability of *S. iniae* NUF631 in normal and immune flounder plasma. O, plasma from fish immunized with NUF631 FK; □, plasma from fish immunized with 6-20 FK; Δ, plasma from non-immunized fish.

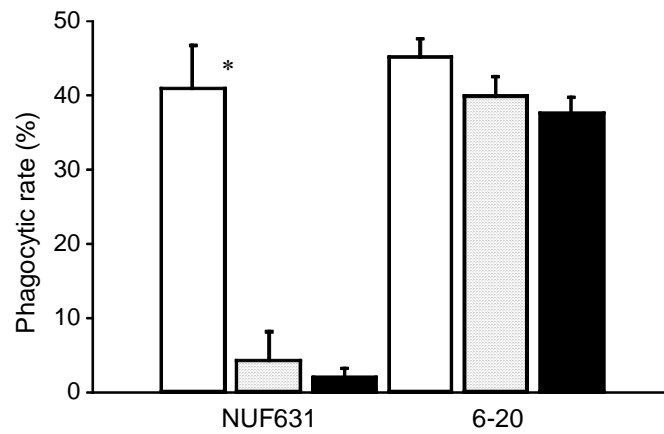


Fig. 21. Phagocytosis of *S. iniae* NUF631 and 6-20 by flounder peritoneal macrophages. Values that are significantly different ($p < 0.01$) from opsonized with normal serum value are indicated by an asterisk. □, opsonized with NUF631 FKC serum; ▨, opsonized with 6-20 FKC serum; ■, opsonized with normal serum.

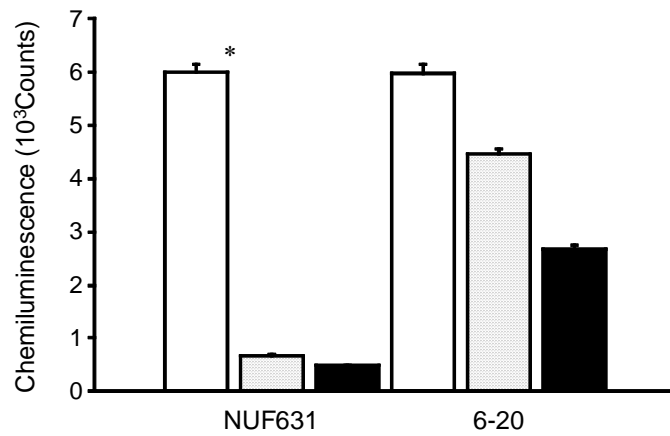


Fig. 22. Chemiluminescence response of flounder peritoneal macrophages to *S. iniae* NUF631 and 6-20 opsonized with immune serum or normal serum. Values that are significantly different ($p < 0.01$) from normal serum value are indicated by an asterisk. □, opsonized with NUF631 FKC serum; ▨, opsonized with 6-20 FKC serum; ■, opsonized with normal serum.

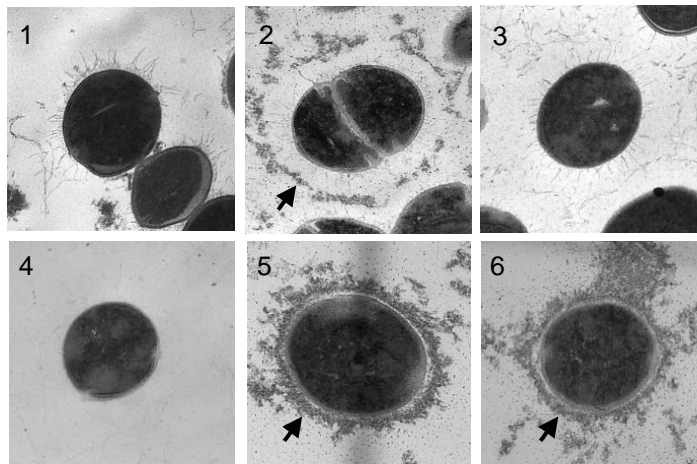


Fig. 23. TEM of *S. iniae* NUF631 and 6-20 pretreated with flounder immune and normal sera. 1: NUF631 FKC + normal serum; 2: NUF631 FKC + NUF631 FKC immune serum; 3: NUF631 FKC + 6-20 FKC immune serum; 4: 6-20 FKC + normal serum; 5: 6-20 FKC + NUF631 FKC immune serum; 6: 6-20 FKC + 6-20 FKC immune serum. Arrow, immune serum component binding to cell surface or capsule.

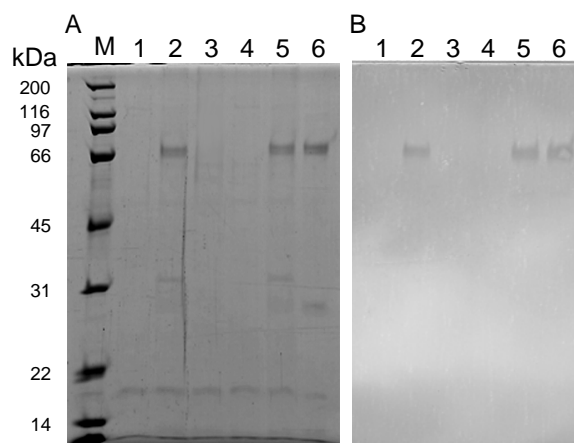


Fig. 24. (A) Detection of serum components bound to cell surface by SDS-PAGE (CBB stain). (B) Detection of immunoglobulin in immune serum bound to cell surface by immunoblotting. Lane M, marker proteins; Lane 1, NUF631 FK + normal serum; 2, NUF631 FK + NUF631 FK immune serum; 3, NUF631 FK + 6-20 FK immune serum; 4, 6-20 FK + normal serum; 5, 6-20 FK + NUF631 FK immune serum; 6, 6-20 FK + 6-20 FK immune serum.

総合考察

S. iniae を原因菌とする β 溶血性レンサ球菌症は 1983 年にその発症例が報告されて以来日本の重要な養殖産業であるヒラメ養殖に甚大な被害を与えてきたが、2005 年から予防ワクチンが実用化され、一応防除法が確立された。しかし、*S. iniae* の病原性や本症に対する免疫防御機構は未だ解明されていない。Kanai ら (2006) はヒラメ病魚由来 *S. iniae* を血清学的性状により K^+ type (強毒株) と K^- type (弱毒株) に分類し、 K^+ type に特異的な菌体表層抗原 (特異抗原) と莢膜の存在を示した。特異抗原も莢膜も K^+ type に特異的なことから双方の関連性が疑われた。そこで本研究では、まず K^+ type 特異抗原を部分精製しその性状について検討した。その結果、 K^+ type の特異抗原は単糖もしくはオリゴ糖の繰り返し構造をとる酸性多糖と考えられた。一般に病原細菌の莢膜はこのような酸性多糖で構成されていることから、特異抗原は酸性多糖であり K^+ type の菌体表層にみられる莢膜の構成成分と考えられた。また粗精製特異抗原でヒラメを免疫すると NUF631 (K^+ type) に対して若干の免疫効果がみられた。Kanai ら (2006) は K^+ type FKC でヒラメを免疫すると強毒株の攻撃に対して防御効果がみられるが、 K^- type FKC で免疫しても防御効果が得られないとしている。このことから特異抗原は *S. iniae* 感染に対する重要な防御抗原であると推察された。しかし、粗精製特異抗原の接種濃度が高くなると免疫効果が低下したことから特異抗原の過剰な接種は本抗原に対する免疫応答を阻害すると考えられた (第一章)。

上述のように *S. iniae* K^+ type 特異抗原は莢膜の構成成分であることが推察

されたため、トランスポゾンを用いて *S. iniae* NUF631 (K^+ type) の特異抗原欠損変異株を作製し、特異抗原と莢膜の関係を検討した。その結果、抗 NUF44 FKC ウサギ血清と凝集するコロニー (K^- type) が 11 株得られ、これらは特異抗原を欠損しており、莢膜も観察されなかった。また、親株の NUF631 と比べて毒力が著しく減弱していた。トランスポゾンの挿入部位に隣接する DNA の塩基配列を調べたところ、6-20、9-16、10-15、11-34、11-36、13-96 の 6 株の配列はヒト由来 *S. iniae* の莢膜合成遺伝子群の構成遺伝子 CpsH、ORF276、CpsH、CpsH、CpsM、CpsI とそれぞれ高い相同性を示した。一般に莢膜合成に関与する遺伝子は複数の遺伝子がオペロンを形成する。これらのことからヒラメ病魚由来 *S. iniae* NUF631 の染色体 DNA にも莢膜合成に関与する遺伝子群が存在し、それら遺伝子がオペロンを形成しており特異抗原の合成に関わっていると考えられた (第二章)。

11 株中 6 株は莢膜合成遺伝子群の構成遺伝子にトランスポゾンが 1 つ挿入されていたため、これら 6 株は莢膜 (特異抗原) のみ欠損したと考えられた。そこで 6-20、9-16、11-36 の莢膜欠損変異株 3 株を用いてヒラメに対する病原性を検討した。血管内接種した菌の魚体内消長試験では、親株、変異株とも接種 30 分後に接種菌数の約 8 割が腎臓で検出され、変異株のみ時間経過と共に生菌数が減少した。このことから、魚体内に侵入した変異株は血管内を移動して腎臓組織などに集積し、局在する食細胞に貪食され殺菌されと考えられた。また、新鮮血清をオプソニンとしてヒラメ腹腔内マクロファージに対する抵抗性を検討した結果、変異株は親株と比べて、マクロファージに対する抗貪食能、抗殺菌能が低下しており、貪食刺激によるマクロファージからの活性酸素誘導能を高めた。これらのことをまとめると、*S. iniae* 莢膜のヒラメに対す

る病原性因子としての役割は、魚体内に侵入した *S. iniae* がマクロファージなど食細胞の貪食作用を回避するのを助け、貪食されても活性酸素の放出を妨げることで細胞内での *S. iniae* の増殖を可能にするところにあると思われる。さらに補体成分を不活化した非働化血清で *S. iniae* をオプソナイズすると変異株の貪食率も低下したことから、莢膜は主に補体を介したマクロファージの貪食作用を阻害していると推察された（第三章）。

第一章では粗精製特異抗原をヒラメに接種すると K^+ type に対する若干の防御効果が得られると述べた。そこで莢膜欠損変異株の FKC でヒラメを免疫し、NUF631 に対する免疫効果試験を行ったところ、莢膜欠損変異株 FKC では防御効果が得られなかった。また NUF631 は抗 NUF631 FKC ヒラメ血漿で殺菌されないが NUF631 FKC 免疫魚の腎臓中で生菌数が減少したため NUF631 は NUF631 FKC 免疫魚の食細胞の殺菌作用を受けていると推察された。また NUF631 FKC 免疫魚の血清で K^+ type FKC が凝集するため魚体内で莢膜に対する特異抗体が産生されていると推察された。さらに NUF631 は抗 NUF631 FKC ヒラメ血清でオプソナイズすると貪食率と活性酸素誘導能が高まった。また、抗 NUF631 FKC ヒラメ血清でオプソナイズした NUF631 の莢膜の周りに電子密度の高い物質が観察され、菌体に結合した血清成分からはヒラメ抗体のヘビーチェーンと思われる約 70 kDa のタンパク質が検出された。以上のことから、NUF631 FKC でヒラメを免疫した場合、魚体内で抗莢膜特異抗体が産生され、抗莢膜特異抗体は NUF631 の莢膜に結合し、マクロファージ上の Fc レセプターを経由することでヒラメ腹腔内マクロファージの貪食作用および活性酸素産生が亢進されると推察した。一方、莢膜欠損変異株 FKC で免疫した場合は抗莢膜特異抗体が産生されないために、食細胞は NUF631 を効率よく貪食できないと考えられた（第

四章)。

本研究から *S. iniae* の莢膜はヒラメに対する病原性因子であり、*S. iniae* 感染に対する感染防御抗原であることが明らかになった。莢膜は本症の病原性に関する最も重要な病原性因子と思われるが、本症の発症過程には他の因子も関わっていると考えられる。今後は莢膜以外の病原性因子についての探索および役割を調べる必要がある。また、本研究では *S. iniae* は莢膜を保有することによりマクロファージの補体を介した貪食メカニズムに対して抵抗性を獲得していると思われるが、この点に関しての分子レベルでの解明は行わなかった。今後は莢膜を構成する多糖構造を明らかにし、莢膜多糖および菌体表面と補体の結合性、マクロファージの補体レセプターや Fc レセプターを介した貪食メカニズムおよび活性酸素産生機構を明らかにすることが重要であると考えられる。

要約

Streptococcus iniae を原因菌とするヒラメ β 溶血性レンサ球菌症はヒラメ養殖に多大な被害を与える細菌性疾病である。これまで本症の治療には抗菌剤が用いられて来たが、食の安全性や抗菌剤に対する耐性化が危惧されるため、ワクチンによる予防法の確立が求められるようになった。しかし本症の感染・発病メカニズムおよび防除メカニズムに関する知見は乏しく、有効なワクチンを開発するためにも防御抗原を特定する必要がある。ヒラメ病魚由来 *S. iniae* は血清学的に K^+ type (莢膜保有) と K^- type (莢膜非保有) の 2 型に分類され、 K^+ type は強毒性で、 K^- type は弱毒性であると報告されている。ヒラメに対する免疫試験では、 K^+ type のホルマリン死菌 (FKC) は有効であるが、 K^- type FKC には効果が認められない。さらに K^+ type のオートクレーブ抽出液に特異抗原が検出される。莢膜も特異抗原も K^+ type に特異的なため、双方の関連性が示唆された。そこで本研究では、まず特異抗原を部分精製してその構造および免疫原性について調べた。次に、 K^+ type から特異抗原欠損変異株を作製し、特異抗原と莢膜の関係、およびヒラメに対する *S. iniae* の病原性と免疫原性における莢膜の役割について検討した。

(第一章) *S. iniae* NUF631 (K^+ type) から部分精製した特異抗原をポリアクリルアミドゲル電気泳動後糖染色したところ、梯子状のバンドパターンが検出された。このことから特異抗原は単糖またはオリゴ糖の繰り返し構造をとる酸性多糖であると考えられた。一般に莢膜は酸性多糖で構成されることから、莢膜と特異抗原の関連性が強く示唆された。また、粗精製特異抗原でヒラメを免

疫すると NUF631 の攻撃に対して若干の感染防御効果が得られたことから、特異抗原が防御抗原である可能性が考えられた。

(第二章) 染色体 DNA 間を移動しうる転移因子 (トランスポゾン) を利用して NUF631 (親株) から特異抗原欠損変異株を作製し、特異抗原と莢膜の関係を調べた。トランスポゾンの挿入により特異抗原欠損変異株が 11 株得られ、それらのオートクレーブ抽出液には酸性多糖が検出されず、莢膜も観察されなかった。また、トランスポゾンに隣接する DNA の塩基配列をシーケンスし相同性検索を行ったところ、11 株中 6 株はデータベース上のヒト由来 *S. iniae* の莢膜合成遺伝子群の構成タンパク、CpsH、ORF276、CpsH、CpsH、CpsM、CpsI と高い相同性を示した。以上のことから特異抗原は酸性多糖であり、莢膜の構成成分であると考えられた。

(第三章) 作製した変異株のヒラメに対する病原性とヒラメ腹腔内マクロファージに対する抵抗性について検討した。病原性試験で変異株は親株に比べて毒力が著しく低下しており、血管内接種された菌は腎臓に取り込まれた後生菌数が減少した。変異株は親株よりもマクロファージに貪食されやすく、貪食の際のマクロファージからの活性酸素の放出量も多かった。またマクロファージ内で生菌数が減少した。このことから *S. iniae* の莢膜はマクロファージの貪食作用および殺菌作用に抵抗する働きを持つと考えられた。

(第四章) 親株と変異株から FKC を作製し、莢膜の防御抗原としての役割を検討した。各 FKC で免疫したヒラメを親株で攻撃すると、親株免疫区の生残率 90 % に対して変異株免疫区の生残率は 20 % 以下であった。したがって、莢膜 (特異抗原) が防御抗原であると考えられた。また、各 FKC で免疫したヒラメから採取した血清をオプソニンとして、腹腔内マクロファージの貪食能と活性

酸素放出能を検討した結果、変異株はどの血清でオプソナイズしても貪食率及び活性酸素放出量が高かったが、親株は抗親株血清でオプソナイズした場合のみ貪食率および活性酸素放出量が上昇した。また、各オプソナイズ菌を電顕観察すると、変異株では抗親株血清および抗変異株血清でオプソナイズした場合に菌体表面に電子密度の高い物質が観察されたのに対して、親株では抗親株血清でオプソナイズした場合にのみ莢膜表面に電子密度の高い物質が観察された。さらに親株の菌体に結合した血清成分を SDS-PAGE 後イムノブロットした結果、親株を抗親株血清でオプソナイズした場合のみ抗体が検出された。このことから親株 FKC で免疫した時に高い効果が得られるのは、抗莢膜抗体が菌体に結合し、マクロファージの食作用および活性酸素放出を促進するからであると考えられた。

以上のことから *S. iniae* の莢膜はマクロファージの食作用および殺菌作用に対する抵抗因子として本菌の病原性に関わっており、莢膜に対する抗体がマクロファージの食作用および殺菌活性を高め、感染防御に関わっていると考えられた。

引用文献

Absolom, D. R. (1988): The role of bacterial hydrophobicity in infection: bacterial adhesion and phagocytic ingestion. *Can. J. Microbiol.*, **34**, 287-298.

Artz, A. S., W. B. Ershler and D. L. Longo (2003): Pneumococcal vaccination and revaccination of older adults. *Clin. Microbiol. Rev.*, **16**, 308-318.

Charland, N., M. Kobisch, B. Martineau-Doizé, M. Jacques and M. Gottschalk (1996): Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **14**, 195-203.

Charland, N., J. Harel, M. Kobisch, S. Lacasse and M. Gottschalk (1998): *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology*, **144**, 325-332.

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Robers and F. Smith (1956): Colorimetric method for determination of sugaes and related substance. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.

Goh, S. W., D. Driedger, S. Gillett, D. E. Low, S. M Hemmingsen, M. Amos, D. Chan, M. Lovgren, B. M. Willey, C. Shaw and J. A. Smith (1998): *Streptococcus iniae*, a human and animal pathogen: specific identification by the chaperonin 60 gene identification method. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2164-2166.

Harrison, L. H. (2006): Prospects for vaccine prevention of meningococcal infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, **19**, 142-164.

Kaige, N., T. Miyazaki and S. Kubota (1984): The pathogen and the histopathology of vertebral deformity in cultured yellowtail. *Fish Pathol.*, **19**, 173-179.

Kanai, K., M. Notohara, T. Kato, K. Shutou and K. Yoshikoshi (2006): Serological characterization of *Streptococcus iniae* strains isolated from cultured fish in Japan. *Fish Pathol.*, **41**, 57-66.

Kitao, T., T. Aoki and R. Sakoh (1981): Epizootic caused by β -haemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. *Fish Pathol.*, **15**, 301-307.

Kitao, T. (1982): The methods for detection of *Streptococcus* sp. causative bacteria of streptococcal disease of cultured yellowtail, *Seriola*

quiqueradiata, especially, their cultural, biochemical and serological properties. *Fish Pathol.*, **17**, 17-26.

Koh TH., A. Kurup and J. Chen (2004): *Streptococcus iniae* discitis in Singapore. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 1694-1696.

Kusuda, R. and T. Tanaka (1988): Opsonic effect of antibody and complement on phagocytosis of *streptococcus* sp. by macrophage-like cells of yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 2065-2069.

Kusuda, R., H. Sato, K. Kawai and M. Ninomiya (1996): Increase in immunobiological activities of yellowtail immunized with Formalin-killed *Enterococcus seriolicida*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **62**, 780-784.

Laemmli, UK. (1970): Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Lau, S. K. P., P. C. Y. Woo, H. Tse, K. W. Leung, S. S. Y. Wong and K. Y. Yuen (2003): Invasive *Streptococcus iniae* infections outside North America. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1004-1009.

Lindahl, G., M. Stålhammar-Carlemalm and T. Areschoug (2005): Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other

bacterial pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.*, **18**, 102-127.

Llull, D., R. López and E. García (2001): Genetic bases and medical relevance of capsular polysaccharide biosynthesis in pathogenic streptococci. *Curr. Mol. Med.*, **1**, 475-91.

Merril, C. R., D. Goldman, S. A. Sedman and M. H. Ebert (1981): Ultrasensitive Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels Shows Regional Variation in Cerebrospinal Fluid Proteins. *Science*, **211**, 1437-1438.

Min, H. and M. K. Cowman (1986): Combined Alcian Blue and Silver Staining of Glycosaminoglycans in Polyacrylamide Gels: Application to Electrophoretic Analysis of Molecular Weight Distribution. *Anal. Biochem.*, **155**, 275-285.

Nakatsugawa, T. (1983): A streptococcal disease of cultured flounder. *Fish Pathol.*, **17**, 281-285.

Nguyen, H. T., K. Kanai and K. Yoshikoshi (2001): Immunohistochemical examination of experimental *Streptococcus iniae* infection in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol.*, **36**, 169-178.

Ooyama, T., A. Kera, T. Okada, V. Inglis and T. Yoshida (1999): The

protective immune response of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) to the bacterial fish pathogen *Lactococcus garvieae*. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 121-126.

O’ Riordan, K. and J. C. Lee (2004): *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**, 218-234.

Pelkonen, S., J. Hayrinen and J. Finne (1988): Polyacrylamide gel electrophoresis of the capsular polysaccharides of *Escherichia coli* K1 and other bacteria. *J. Bacteriol.*, **170**, 2646-2653.

Perera, R. P., S. K. Johnson, M. D. Collins and D. H. Lewis (1994): *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* × *T. aurea* hybrids. *J. Aquat. Anim. Health*, **7**, 335-340.

Pier, G. B. and S. H. Madin (1976): *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **26**, 545-553.

Rosenberg, M., D. Gutnick and E. Rosenberg (1980): Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity.

FEMS Microbiol. Lett., **9**, 29-33.

Sakai, M., S. Atsuta and M. Kobayashi (1989): Protective immune response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, vaccinated with β -haemolytic streptococcal bacterin. *Fish Pathol.*, **24**, 169-173.

Shimoji, Y., Y. Yokomizo and Y. Mori (1996): Intracellular survival and replication of *Erysipelothrix rhusiopathiae* within murine macrophages: failure of induction of the oxidative burst of macrophages. *Infect. Immun.*, **64**, 1789-1793.

Stingele F, J-R. Neeser and B. Mollet (1996): Identification and characterization of the *eps* (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J. Bacteriol.*, **178**, 1680-1690.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354

Weinstein, M. R., M. Litt, D. A. Kertesz, P. Wyper, D. Rose, M. Coulter, A. McGeer, R. Facklam, C. Ostach, B. M. Willey, A. Borczyk and D. E. Low (1997): Invasive infections due to fish pathogen, *Streptococcus iniae*. *N. Engl. J. Med.*, **337**, 589-594.

Winkelstein, J. A., A. S. Abramovitz and A. Tomasz (1980): Activation of C3 via the alternative complement pathway results in fixation of C3b to the pneumococcal cell wall. *J. Immunology*, **124**, 2502-2506.

Yoshida, T., T. Eshima, Y. Wada, Y. Yamada, E. Kakizaki, M. Sakai, T. Kitao and V. Inglis (1996a): Phenotypic variation associated with an anti-phagocytic factor in the bacterial fish pathogen *Enterococcus seriolicida*. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 81-86.

Yoshida, T., Y. Yamada, M. Sakai, V. Inglis, X. J. Xie and S. C. Chen (1996b): Association of the cell capsule with anti-opsonophagocytosis in β -hemolytic *Streptococcus* spp. isolated from rainbow trout. *J. Aquat. Anim. Health*, **8**, 223-228.

Yoshida, T., M. Endo, M. Sakai and V. Inglis (1997): A cell capsule with possible involvement in resistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolicida* isolated from yellowtail *Seriola quiqueradiata*. *Dis. Aquat. Org.*, **29**, 233-235.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇切なる御指導、御教授をいただいた長崎大学水産学部教授金井欣也博士に深謝の意を表するとともに、本論文作成にあたり種々の御助言ならびに御指導いただいた長崎大学水産学部教授吉越一馬博士と長崎大学水産学部教授藤田雄二博士に厚く御礼申し上げます。

また研究遂行に際して実験施設の供与等多大なる便宜を図っていただいた長崎県総合水産試験場 高見生雄氏はじめ環境養殖技術開発センター養殖技術科 諸氏に厚く御礼申し上げます。本論文作成にあたり多くの御助言をいただいた杉下佳之氏ならびに実験遂行にあたりご協力いただいた本研究室学生諸氏に厚く御礼申し上げます。